

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE
Aspidosperma polyneuron Müll. Arg. (PEROBA-ROSA)**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor, Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, Setor de
Ciências Agrárias, Área de concentração:
Silvicultura, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette

CURITIBA

1999



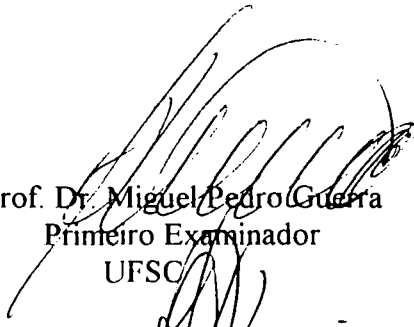
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA FLORESTAL

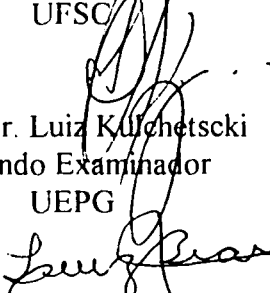
P A R E C E R

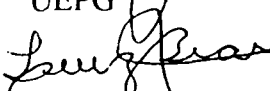
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO**, apresentada pela candidata **LUCIANA LOPES FORTES RIBAS**, sob o título "**MORFOGÊNESE IN VITRO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (PEROBA-ROSA)**". para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Florestais, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Área de Concentração **SILVICULTURA**.

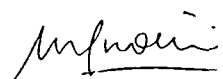
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese, com média final: (*9,8*), correspondente ao conceito (*A*).

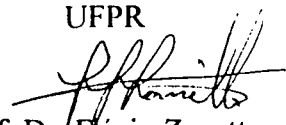
Curitiba, 11 de junho de 1999.


Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Primeiro Examinador
UFSC


Prof. Dr. Luiz Kulchetski
Segundo Examinador
UEPG


Prof. Dr. Luis Antônio Biasi
Terceiro Examinador
UFPR


Prof. Dra. Marguerite Quoirin
Quarta Examinadora
UFPR


Prof. Dr. Flávio Zanette
Orientador e Presidente da Banca
UFPR



AGRADECIMENTOS

Ao Professor Flávio Zanette pela orientação, incentivo e ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Miguel Pedro Guerra pelas valiosas sugestões, pela co-orientação e por permitir a utilização de equipamentos e de diversos materiais no Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Genético Vegetais, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Professor Luiz Kulchetski pela co-orientação, incentivo e sugestões.

Ao Professor Edilberto Possamai pela co-orientação, pelas sugestões e informações no planejamento experimental e nas análises estatísticas.

Ao Dr. Edilson B. de Oliveira pelos auxílios prestados nas análises estatísticas.

À Dra. Marcia B. Figliolia, do Instituto Florestal de São Paulo e ao Instituto Ambiental do Paraná pelas coletas de frutos de peroba-rosa.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal por permitir a realização do curso e à CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos Funcionários Gilson Machado Rosa e Humberto Queiroz pelos auxílios prestados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

À Fundação O Boticário de Proteção à Natureza e Fundação Mac Arthur pelo financiamento de projeto que deu início a essa pesquisa.

À Professora Thelma A.V. Ludwig, Chefe do Departamento de Botânica da UFPR, demais professores e funcionários deste departamento, em especial Narciso Suckow de Castro, pelos auxílios e por permitirem a finalização deste trabalho.

Ao Professor Yedo Alquini pelos ensinamentos e por permitir a utilização do Laboratório de Microtécnica da UFPR e ao funcionário Nilson Belém Filho pelos auxílios na confecção de lâminas histológicas. Aos Professores Gedir de O. Santos e Katia Z. Ribas pelo apoio e auxílios prestados.

Ao Lirio Dal Vesco pela amizade, pelas informações concedidas e pelos auxílios nas fotografias e na elaboração dos gráficos.

À Leila Teresinha Maranhão pela amizade, prestatividade e auxílios prestados na confecção das pranchas fotográficas.

À Rosana e Antonio Higa e Luiz Antonio Biasi pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao meu esposo Josemar e aos meus familiares pelos ensinamentos, auxílios prestados e compreensão durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVOS GERAIS	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> Müll. Arg.	5
3.2 MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	7
3.3 SISTEMAS DE PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i>	11
3.4 ORGANOGÊNESE	11
3.4.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes	12
3.4.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas	14
3.4.2.1 Meio de cultura	15
3.4.2.2 Fitorreguladores	16
3.4.2.3 Ambiente de cultivo	18
3.4.3 Estágio 2: Indução de brotações múltiplas	18
3.4.4 Estágio 3: Alongamento, indução e desenvolvimento de raízes	20
3.4.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de mudas	21
3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	22
3.5.1 Ocorrência natural da embriogênese somática	23
3.5.2 Padrões da embriogênese somática	23
3.5.3 Caracterização das células embriogênicas	25
3.5.4 Controle da embriogênese somática	28
3.5.4.1 Fonte de explantes	30
3.5.4.2 Meio de cultura	31
3.5.4.3 Fitorreguladores	33
3.5.5 Aspectos morfológicos	34
3.5.6 Condições ambientais.....	35
3.5.7 Controle genético	35
3.5.8 Estágios da embriogênese somática	35
3.5.8.1 Iniciação de culturas embriogênicas	35
3.5.8.2 Manutenção, multiplicação e cultura massal	36
3.5.8.3 Desenvolvimento e maturação.....	37
3.5.8.4 Conversão dos embriões somáticos em plantas.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ORGANOGÊNESE	40
4.1.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes	40
4.1.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas	40
4.1.2.1 Experimento 1: Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações apicais realizada no verão e no outono de 1992	41
4.1.2.2 Experimento 2: Efeito do HgCl ₂ na desinfestação de brotações apicais realizada no inverno e primavera de 1992	41

4.1.2.3	Experimento 3: Efeito do $HgCl_2$ na desinfestação de brotações apicais realizada durante as estações do ano de 1993	42
4.1.2.4	Meio de cultura	42
4.1.3	Estágio 2: Obtenção de brotações múltiplas	43
4.1.3.1	Avaliações preliminares	43
4.1.3.2	Experimento 1: Efeito da ZEA, BAP e Cin na indução de brotações múltiplas em brotações apicais	43
4.1.3.3	Experimento 2: Efeito de combinações de fitorreguladores na obtenção de brotações múltiplas	44
4.1.3.4	Experimento 3: Efeito de fitorreguladores na indução de brotações múltiplas em explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas <i>in vitro</i>	44
4.1.4	Estágio 3: Enraizamento	44
4.1.4.1	Avaliações preliminares	44
4.1.4.2	Experimento 1: Efeito de tratamentos pulsos com soluções de AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações oriundas de mudas de dois anos de idade	45
4.1.4.3	Experimento 2: Efeito de tratamentos pulsos com soluções de AIB (pH5,6) no enraizamento <i>in vitro</i>	45
4.1.4.4	Experimento 3: Efeito dos tratamentos pulsos com solução de AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações originadas do epicótilo e hipocótilo	46
4.1.4.5	Experimento 4: Efeito das condições de luminosidade no enraizamento <i>in vitro</i>	46
4.1.5	Estágio 4: Transplântio e aclimatização de mudas	47
4.2	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	47
4.2.1	Coleta de frutos e obtenção de sementes	47
4.2.2	Desinfestação das sementes.....	48
4.2.3	Iniciação de culturas embriogenéticas	48
4.2.3.1	Fonte de explantes	48
4.2.3.2	Meio de cultura	48
4.2.3.3	Fitorreguladores	49
4.2.4	Indução, multiplicação e manutenção de linhagens celulares embriogenéticas	50
4.2.5	Maturação dos embriões somáticos e linhagens embriogenéticas.....	50
4.2.6	Conversão de embriões somáticos em planta.....	50
4.2.7	Avaliações histológicas.....	51
4.2.8	Avaliações citoquímicas.....	51
4.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	ORGANOGENESE	53
5.1.1	Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas	53
5.1.1.1	Avaliações preliminares	53
5.1.1.2	Experimento 1: Efeito do $NaOCl$ na desinfestação de brotações apicais realizada no verão e no outono de 1992	53
5.1.1.3	Experimento 2: Efeito do $HgCl_2$ na desinfestação de brotações apicais realizada no inverno e primavera de 1992	55
5.1.1.4	Experimento 3: Efeito do $HgCl_2$ na desinfestação de brotações apicais realizada durante as estações do ano de 1993	58
5.1.2	Estágio2: Obtenção de brotações múltiplas	62
5.1.2.1	Avaliações preliminares.....	62
5.1.2.2	Experimento 1: Efeito da ZEA, BAP e Kin na indução de brotações múltiplas em brotações apicais	65
5.1.2.3	Experimento 2: Experimento 3: Efeito de fitorreguladores na indução de brotações múltiplas em explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas <i>in vitro</i>	69
5.1.2.4	Experimento 3: Experimento 3: Efeito de fitorreguladores na indução de brotações múltiplas em explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas <i>in vitro</i>	70
5.1.3	Estágio 3: Enraizamento	75
5.1.3.1	Avaliações preliminares	75

5.1.3.2	Experimento 1: Efeito de tratamentos pulsos com soluções de AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações oriundas de mudas de dois anos de idade	76
5.1.3.3	Experimento 2: Efeito de tratamentos pulsos com soluções de AIB (pH 5,6) no enraizamento <i>in vitro</i>	77
5.1.3.4	Experimento 3: Efeito dos tratamentos pulsos com solução de AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações originadas do epicótilo e hipocótilo	78
5.1.3.5	Experimento 4: Efeito das condições de luminosidade no enraizamento <i>in vitro</i>	79
5.1.4	Transplântio e aclimatização de mudas.....	80
5.2	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	81
5.2.1	Avaliações preliminares.....	81
5.2.2	Indução e iniciação de embriões somáticos.....	83
5.2.2.1	Fonte de explantes.....	83
5.2.2.2	Meio de cultura.....	84
5.2.2.3	Fitorreguladores	85
5.2.2.3.1	Respostas dos embriões maduros às combinações de fitorreguladores	86
5.2.2.3.2	Respostas dos embriões imaturos às combinações de fitorreguladores	89
5.2.2.3.3	Padrões da embriogênese somática	91
5.2.3	Indução, multiplicação e manutenção de linhagens celulares embriogenéticas	97
5.2.4	Maturação dos embriões somáticos e das linhagens embriogenéticas	100
5.2.5	Conversão de embriões somáticos em plantas	105
5.2.6	Avaliações histológicas	108
5.2.7	Avaliações citoquímicas	114
6	SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	118
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	120
	FIGURAS	122
	ANEXOS.....	152
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159

LISTA DE FIGURAS

1	COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM NaOCl EM BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> REALIZADOS NO VERÃO (A) E OUTONO (B) DE 1992	123
2	COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM HgCl ₂ EM BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> REALIZADOS NO INVERNO (A) E PRIMAVERA (B) DE 1992	124
3	COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM HgCl ₂ EM BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> REALIZADOS NO VERÃO (A) E OUTONO DE 1993	125
4	COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM HgCl ₂ EM BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> REALIZADOS NO INVERNO (A) E PRIMAVERA (B) DE 1993	126
5	EFEITO DOS NÍVEIS DE FITORREGULADORES NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL (A), PRIMEIRO (B) E SEGUNDO SUBCULTIVO (C).....	127
6	EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA, NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL DE EXPLANTES DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS <i>IN VITRO</i>	128
7	EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , OBTIDAS NO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM EXPLANTES ORIUNDOS DA REGIÃO DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS <i>IN VITRO</i>	129
8	EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , OBTIDAS NO SEGUNDO SUBCULTIVO EM EXPLANTES ORIUNDOS DA REGIÃO DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS <i>IN VITRO</i>	130
9	EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , OBTIDAS NO TERCEIRO SUBCULTIVO EM EXPLANTES ORIUNDOS DA REGIÃO DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS <i>IN VITRO</i>	131
10	EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB NO ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i>	132
11	EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB (pH=5,6) NO ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i>	132
12	EFEITOS DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB NO ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> ORIGINADAS DA REGIÃO DO EPICÓTILO E DO HIPOCÓTILO	133
13	PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MUDAS DE <i>A. polyneuron</i> PELA ROTA ORGANOGÊNICA	134
14	ROTAS DE INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS EMBRIOGENÉTICAS DE <i>A. polyneuron</i>	135
15	<i>Aspidosperma polyneuron</i> . A- ASPECTO GERAL DA ÁRVORE; B- E C- FRUTOS IMATUROS; D- SEMENTES IMATURAS COLETADAS NO MÊS DE JUNHO NO INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO; E- EMBRIÕES DE SEMENTE POLIEMBRIÔNICA	136

- 16 A- MUDAS DE *A. polyneuron* COM DOIS ANOS DE IDADE, CRESCENDO EM CASA DE VEGETAÇÃO CLIMATIZADA; B- DETALHE DAS BROTAÇÕES APICAIS PULVERIZADAS COM BENOMYL ($0,5 \text{ g L}^{-1}$); C- E D- BROTAÇÕES EMITIDAS APÓS PODAS REALIZADAS NO INVERNO (JUNHO E JULHO); E- E F- EXPLANTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS 1 E 2 DA ETAPA DE OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS 137

- 17 A- ESTABELECIMENTO DOS EXPLANTES DE *A. polyneuron* EM MEIO DE CULTURA MS/2; B-D- CULTIVO INICIAL DE BROTAÇÕES EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE: B- $2,25 \mu\text{M}$ DE Cin E $1,25 \mu\text{M}$ DE AIB; C- $4,45 \mu\text{M}$ DE ZEA E $1,25 \mu\text{M}$ DE AIB; D- $8,8 \mu\text{M}$ DE BAP; E-G- BROTAÇÕES DO PRIMEIRO SUBCULTIVO SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM: E- $8,8 \mu\text{M}$ DE Cin; F- $8,8 \mu\text{M}$ DE ZEA; G- $4,4 \mu\text{M}$ DE BAP; G- BROTAÇÕES OBTIDAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM $8,8 \mu\text{M}$ DE BAP; BROTAÇÕES OBTIDAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE $0,25 \mu\text{M}$ DE TDZ E TRANSFERIDAS PARA MEIO DE CULTURA ISENTA DE FITORREGULADORES, COM $0,1\%$ DE CARVÃO ATIVADO; J- BROTAÇÕES OBTIDAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO $2,25 \mu\text{M}$ DE BAP E $1,25 \mu\text{M}$ DE AIB 138

- 18 A- GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES POLIEMBRIÔNICAS DE *A. polyneuron*. B-D BROTAÇÕES DO EPICÓTILO NO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM: B- $8,8 \mu\text{M}$ DE Cin; C- $8,8 \mu\text{M}$ DE ZEA E D- $8,8 \mu\text{M}$ DE TDZ; E-F BROTAÇÕES DO TERCEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM: E- $10 \mu\text{M}$ DE BAP; F- $10 \mu\text{M}$ DE BAP E $0,5 \mu\text{M}$ DE AIB 139

- 19 A- BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* ENRAIZADAS NO MEIO DE CULTURA DE ESTABELECIMENTO WPM; B-BROTAÇÕES DO EPICÓTILO ENRAIZADAS DURANTE CULTIVO INICIAL EM MEIO DE CULTURA WPM, COM $0,5 \mu\text{M}$ DE AIB; C- BROTAÇÃO DO EPICÓTILO DO QUARTO SUBCULTIVO, ENRAIZADA COM 5 mM DE AIB DURANTE 15 MINUTOS; D- BROTAÇÃO DO HIPOCÓTILO ENRAIZADA COM 10 mM DE AIB DURANTE 15 MINUTOS; E-SOBREVIVÊNCIA DE MUDAS TRANSPLANTADAS EM BANDEJA DE SEMEADURA APÓS UM MÊS DE PERMANÊNCIA EM CASA DE VEGETAÇÃO CLIMATIZADA; F-G MUDAS REGENERADAS *IN VITRO*, APÓS TRÊS MESES DE ACLIMATIZAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO 140

- 20 A- CALO COMPACTO GRANULOSO DE *A. polyneuron* OBTIDO DE DISCO FOLIAR, SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM $10,0 \mu\text{M}$ DE 2,4-D E $2,50 \mu\text{M}$ DE Cin, 24 SEMANAS APÓS INOCULAÇÃO ($1,25\text{X}$); B- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS EM SUA SUPERFÍCIE, 12 SEMANAS APÓS INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA LPM, COM $4,5 \mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,45 \mu\text{M}$ DE TDZ ($2,5\text{X}$); C- PARTE DA MASSA CELULAR (B) SUBCULTIVADA PARA MEIO DE CULTURA LPm, ADICIONADO DE $2,25 \mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,45 \mu\text{M}$ DE Cin, APÓS 8 SEMANAS DA INOCULAÇÃO ($2,5 \text{ X}$); D- OUTRA PARTE DA MASSA CELULAR SUBCULTIVADA PARA MEIO DE CULTURA LPm, CONTENDO $12,30 \mu\text{M}$ DE 2-iP E $0,5 \mu\text{M}$ DE ANA, APÓS 8 SEMANAS DA INOCULAÇÃO ($2,5\text{X}$); E- MASSA CELULAR MOSTRANDO ASSINCRONIA DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO LPm, ISENTA DE FITORREGULADORES, APÓS 4 SUBCULTIVOS ($2,5\text{X}$); F- EMBRIÕES SOMÁTICOS APÓS 20 SEMANAS DA INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM $4,5 \mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,45 \mu\text{M}$ DE BAP ($1,9 \text{ X}$) 141

- 21 A- CALO COMPACTO COM EMBRIÃO SOMÁTICO NA SUA SUPERFÍCIE, APÓS 20 SEMANAS DA INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO 4,5µM DE 2,4-D E 0,45µM DE BAP (1,25X); B- EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES INDUZIDOS NA REGIÃO COTILEDONAR DE EMBRIÕES IMATUROS, APÓS 18 SEMANAS DA INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE 10 µM DE 2,4-D E 0,5µM DE Cin (3,1X); C- FORMAÇÃO DE MASSA CELULAR NA REGIÃO COTILEDONAR DE UM EMBRIÃO IMATURO PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 1,25 µM DE 2,4-D E 0,5 µM DE Cin, APÓS CINCO SUBCULTIVOS (1,25X); D E E- EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES FORMADOS NA REGIÃO DO NÓ COTILEDONAR, EM MEIO DE CULTURA LPm, COM 5 µM DE 2,4-D, 0,5 µM DE Cin E 0,5 µM DE BAP, APÓS SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA LPm, SUPLEMENTADO COM 24,60 µM DE 2-iP E 0,5 µM DE ANA (D-1,25X E E-3,1X); F-G- EMBRIÕES SOMÁTICOS INDUZIDOS EM MEIO DE CULTURA MS, ACRESCIDOS DE: F- 10 µM DE 2,4-D E 0,5µM DE Cin (1,9X) E G- 5 µM DE 2,4-D E 0,5µM DE TDZ (1,9X) 142
- 22 A- MASSA CELULAR EMBRIOGENÉTICA GRANULAR E FRIÁVEL PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPM, ADICIONADO DE 0,5 µM DE 2,4-D E 0,5 µM DE Cin (1,9X); B- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES, OBTIDA A PARTIR DE EMBRIÃO IMATURO E SE DESENVOLVENDO APÓS CINCO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 1,25 µM DE 2,4-D E 0,5 µM DE Cin (1,9X); C- MASSA CELULAR PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPm, ISENTO DE FITORREGULADORES, APÓS 12 SUBCULTIVOS (1,25X); D- MASSA GRANULOSA FINA OBTIDA APÓS 10 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 12,30µM DE 2-iP E 0,5 µM DE ANA (1,25X); E- EMBRIÕES SOMÁTICOS SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM 12,30 µM DE 2-iP E 0,5 µM DE ANA (1,9X); F- EMBRIÃO SOMÁTICO NO ESTÁDIO TORPEDO SUBCULTIVADO PARA MEIO DE CULTURA LPm (1,9X)..... 143
- 23 A- MASSA CELULAR PROLIFERANDO APÓS 9 SUBCULTIVOS E COM EMBRIÕES SOMÁTICOS SE DESENVOLVENDO DE FORMA ASSINCRÔNICA EM MEIO DE CULTURA LPm, CONTENDO 12,30 µM DE 2-iP E 0,5 µM DE ANA; B-MASSA CELULAR CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA LPm, COM 0,1% DE CARVÃO ATIVADO (1,25X); C- EMBRIOGÊNESE REPETITIVA EM MEIO DE CULTURA LPm, ISENTO DE FITORREGULADORES (3,1X); D- MASSA CELULAR COM ALTA FREQUÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 30 µM DE ABA (1,25X); E- MASSA CELULAR PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPm, COM 5 mM DE PEG 8000 (1,25X); F- EMBRIÕES SOMÁTICOS ANORMAIS (FASCIAÇÃO), APÓS 12 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA LPm, CONTENDO 12,30 µM DE 2-iP E 0,5µM DE ANA (1,9X) 144
- 24 SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO DE SEMENTE POLIEMBRIÔNICA DE *A. polyneuron*. (chr= eixo hipocótilo-radicula, ct= cotilédone, pd= protoderme, mf= meristema fundamental, pc= procâmbio) 145
- 25 A-F ESTÁDIOS DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *A. polyneuron* EM MEIO DE CULTURA LPm CONTENDO 12,30 µM DE 2-iP E 0,5 µM DE ANA. A- SECÇÃO LONGITUDINAL DA FORMAÇÃO DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR, PRÓ-EMBRIÃO (pe), COM CÉLULAS ISODIAMÉTRICAS, EM DIVISÃO ATIVA, DENSAMENTE CITOPLASMÁTICAS, COM NÚCLEO GRANDE E NUCLEOLO PROEMINENTE; B- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR (eg); C- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR E CORDIFORME (ec); D- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO TORPEDO (et); E- SECÇÃO TRANSVERSAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO CORDIFORME (ec), F- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO COTILEDONAR (ect) 146

26	SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO COTILEDONAR DE <i>A. polyneuron</i> (ct= cotilédones, pd= protoderme, mf= meristema fundamental, pc= procâmbio)	147
27	A- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO COTILEDONAR; B- E C- DIFERENCIAÇÃO DOS PRIMEIROS ELEMENTOS TRAQUEAIS DO PROTOXILEMA; D- DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS NA REGIÃO DO HIPOCÓTILO (es= embrião somático secundário; etp= elemento traqueal do protoxilema)	148
28	A- E B- SECÇÃO TRANSVERSAL MOSTRANDO A FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES A PARTIR DA EPIDERME E CAMADAS SUB-EPIDÉRMICAS; C- E D- SECÇÃO LONGITUDINAL DA FORMAÇÃO DE CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS CALOSAS ; E- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR NA SUPERFÍCIE DE EMBRIÕES SOMÁTICOS ANORMAIS; F- E G- COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS (F) E CÉLULAS CALOSAS (G) .	149
29	A- E B- MASSAS CELULARES UTILIZADAS NOS TESTES CITOQUÍMICOS; A- MASSA CELULAR GRANULOSA E FRIÁVEL PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPm, SUPLEMENTADO COM 1,25 μ M DE 2,4-D E 0,5 μ M DE Cin, APÓS OITO SUBCULTIVOS (1,9X); B- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES EM SUA SUPERFÍCIE COLOCADA EM MEIO DE CULTURA LPm, CONTENDO 30 μ M DE ABA (1,25X); C- EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES SE DESENVOLVENDO NA SUPERFÍCIE DA MASSA (B) E CORADOS COM CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS (5X); D- E E- AGLOMERADOS CELULARES FORTEMENTE CORADOS COM CARMIN ACÉTICO; F- CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS, DE TAMANHO PEQUENO (20-30 μ M), ISODIAMÉTRICAS, CORADAS COM CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS	150
30	A- E B- CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS QUE REAGIRAM FORTEMENTE AO CARMIN ACÉTICO; C-E- CÉLULAS APRESENTANDO GRÃOS DE AMIDO QUE REAGIRAM AO LUGOL; F-H- CÉLULAS CONTENDO CORPOS LIPÍDICOS QUE REAGIRAM AO SUDAM III (a= grãos de amido; cl= corpos lipídicos)	151

LISTA DE TABELAS

1 DESINFESTAÇÃO DE ESPÉCIES LENHOSAS COM HgCl ₂ e NaOCl	15
2 OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS DE ESPÉCIES LENHOSAS	19
3 TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB NA INDUÇÃO DE RAÍZES DE ESPÉCIES LENHOSAS	21
4 INTENSIDADE DE NECROSE (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM NaOCl.	53
5 CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM NaOCl.....	54
6 SOBREVIVÊNCIA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM NaOCl.	55
7 INTENSIDADE DE NECROSE (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	55
8 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	56
9 CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	57
10 SOBREVIVÊNCIA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	57
11 INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA INTENSIDADE DE NECROSE (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	58
12 INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	59
13 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE TRATAMENTO E ÉPOCA DO ANO NA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS DE <i>A. polyneuron</i> DESINFESTADAS COM HgCl ₂	60
14 INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA SOBREVIVÊNCIA (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS <i>A. polyneuron</i> QUE FORAM DESINFESTADAS COM HgCl ₂	61
15 TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM FITORREGULADORES.....	65
16 TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> OBTIDAS NO PRIMEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM FITORREGULADORES	66
17 TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> OBTIDAS NO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM FITORREGULADORES	66

18	TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES	69
19	TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , PROVENIENTES DO EPICÓTILO E OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM BAP, COMBINADO OU NÃO COM AIB OU ANA	71
20	TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , PROVENIENTES DO HIPOCÓTILO E OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM BAP, COMBINADO OU NÃO COM AIB OU ANA	72
21	ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , SUBMETIDAS AOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB	77
22	ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> , DO 6º e 7º SUBCULTIVO, TRATADAS COM SOLUÇÕES DE AIB (2,5–10mM, COM pH AJUSTADO EM 5,6), DURANTE 5 E 15 MINUTOS	78
23	ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> ORIGINADAS DA REGIÃO DO EPICÓTILO E HIPOCÓTILO E SUBMETIDAS AOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB DURANTE 15 MINUTOS	79
24	ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE <i>A. polyneuron</i> ORIGINADAS DO EPICÓTILO, TRATADAS COM 10 mM DE AIB E MANTIDAS EM CONDIÇÕES DIFERENTES DE LUMINOSIDADE	80
25	RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE EMBRIÕES MADUROS DE <i>A. polyneuron</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA = ácido abscísico
AIA= ácido indol-3-acético
AIB = ácido indol-3-butírico
ANA = ácido naftalenoacético
BAP = 6-benzilaminopurina
CH = caseína hidrolisada
C.V.= coeficiente de variação
DKW= DRIVER e KUNIYUKI, 1984
2,4-D = ácido 2,4 diclorofenoxiacético
2-iP = N⁶-(2- isopentenil)adenina
GD= GRESSHOFF e DOY, 1972
Gln = glutamina
HgCl₂ = bicloreto de mercúrio
Kin = cinetina = 6-furfurilaminopurina
LPm = VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981
MS = MURASHIGE e SKOOG, 1962
NaOCl = hipoclorito de sódio
PEG = polietileno glicol com peso molecular 8.000
QL= QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977
TDZ = thidiazuron = N-fenil-N¹,2,3-thiadiazol-5-yl urea
WPM = LLOYD e McCOWN, 1980
ZEA = zeatina = 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina

RESUMO

No presente trabalho estudou-se a morfogênese *in vitro* e os fatores que controlam a organogênese e embriogênese somática para estabelecer um protocolo de micropropagação de *Aspidosperma polyneuron*. Foram realizados experimentos com hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio para desinfestação de brotações apicais e sementes visando o estabelecimento de culturas assépticas. No estudo da organogênese, brotações apicais de mudas de dois anos de idade, mantidas em casa de vegetação, foram avaliadas na indução de brotações múltiplas em meio de cultura WPM, suplementado com BAP, ZEA ou Cin (2,2-8,8 μM), no cultivo inicial e em dois subcultivos. Explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas *in vitro* também foram testados em meio de cultura WPM, acrescido de BAP (2,5-10,0 μM), combinado ou não com AIB ou ANA (0,5 μM), durante três subcultivos. Para indução de brotações alongadas foram testadas combinações de fitorreguladores 2,25 μM de BAP, ZEA ou Cin, com 1,25 μM de AIB. A indução de raízes foi avaliada com tratamentos pulsos de soluções de AIB (2,5-10 mM), durante 5 ou 15 minutos. As mudas enraizadas foram plantadas em casa-de-vegetação climatizada. O estudo da embriogênese somática foi realizado visando determinar a melhor fonte de explantes, o estado fisiológico, a influência das formulações salinas, dos fitorreguladores, da consistência dos meios de cultura e o tempo necessário para expressão das respostas morfogenéticas. Avaliações histológicas e citoquímicas foram realizadas para caracterizar células embriogênicas e embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento. A desinfestação de brotações apicais foi eficiente com 0,25% de NaOCl ou 0,05% de HgCl_2 , durante 10 minutos e das sementes com 1% de NaOCl, durante 20 minutos, sendo obtida 72,89%, 70-90% e 90% de sobrevivência, respectivamente. Em todas as estações do ano foram estabelecidas culturas assépticas, apesar de que na primavera e verão foram obtidos os melhores resultados. Brotações apicais induziram as maiores taxas médias de regeneração de brotações axilares (4 a 5) em meio de cultura WPM, suplementado com ZEA ou BAP (4,4-8,8 μM), após o segundo subcultivo. Concentrações mais reduzidas de BAP ou ZEA (2,25 μM) e 1,25 μM de AIB proporcionaram em média, três brotações mais alongadas. Os explantes provenientes da região do hipocótilo apresentaram taxas médias de regeneração de brotações e percentagens de enraizamento mais elevadas do que os do epicótilo. Os maiores números médios de brotações (7 a 8) ocorreram em meio de cultura, acrescido de 10 μM de BAP no terceiro subcultivo. A presença de 0,5 μM de AIB ou ANA, combinadas com BAP (2,5; 5 e 10 μM) não afetaram as taxas médias de regeneração de brotações. Tratamentos pulsos com soluções de 10 mM de AIB, durante 15 minutos foram eficientes na indução de raízes (80%) e as mudas transplantadas apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 90%, em casa de vegetação climatizada. A indução e desenvolvimento de embriões somáticos ocorreu a partir de embriões maduros e imaturos inoculados em meios de cultura semi-sólidos (LPm, WPM e MS), suplementados com 2,4-D (5 ou 10 μM) e 0,5 μM de Cin, BAP ou TDZ, na ausência de luz. A indução e expressão da rota de embriogênese somática de culturas primárias foi de baixa frequência e de forma assíncrona. Foram observados os padrões diretos e indiretos de expressão da embriogênese somática dependendo do estado fisiológico dos embriões inoculados. O período médio, que iniciaram os eventos da embriogênese somática, foi de 12 a 16 semanas após a inoculação. O estabelecimento e manutenção de linhagens celulares embriogênicas ocorreu em meio de cultura LPm, suplementado com 0,5 μM de 2,4-D ou ANA e 0,5 μM de Cin, sendo estabelecidos ciclos repetitivos de divisão celular por mais de três anos, permitindo o "scale-up" de culturas embriogênicas. A maturação dos embriões somáticos ocorreu em meio de cultura LPm, suplementado com 12,30 μM ou 24,60 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA e das linhagens celulares embriogênicas com 30 μM de ABA. Avaliações citoquímicas permitiram a caracterização de células embriogênicas e indicaram a presença de corpúsculos lipídicos e grãos de amido. Avaliações histológicas permitiram caracterizar células embriogênicas e embriões somáticos em vários estádios ontogênicos.

ABSTRACT

This work studied morphogenesis *in vitro*, organogenesis and somatic embryogenesis regulation to establish a micropropagation protocol of *Aspidosperma polyneuron*. Apical shoots and seeds were disinfested with NaOCl and HgCl₂ to establish aseptic cultures. Apical shoots were used to evaluate induction of multiple shoots in WPM medium, supplemented with ZEA, BAP and Kin (2.2-8.8 μM). Epicotyl and hypocotyl explants were tested in WPM medium with BAP (2.5, 5.0, 10.0 μM), with and without IBA or NAA (0.5 μM). IBA pulse treatments (2.5, 5.0, 10.0 mM) were tested at 5 and 15 minutes to induce roots. Plantlets were planted in a climatized greenhouse. Somatic embryogenesis studies were established to determine the explants, the physiological state of the explants, the influence of the culture medium consistency, salts formulations, phyto regulators and the necessary time to induction and expression of the morphogenetic responses. Cytochemical and histological evaluations were performed to characterize embryogenic cells and the stages of somatic embryos development. Efficient apical shoots disinfestation were achieved with NaOCl (0.25%-10 minutes) or HgCl₂ (0.05%-10 minutes) and seed disinfestation with NaOCl (1%-20 minutes); survival rates were 72.89%, 70-90% and 90%, respectively. Spring and summer had the highest survival rates. Apical shoots induced 4-5 axillary buds in WPM culture medium, containing ZEA or BAP (4.4-8.8 μM) following two subcultures. Reduced concentrations of ZEA or BAP (2.25 μM), combined with IBA (1.25 μM) produced long shoots. Hypocotyl explants showed an increase of the shoot regeneration and the rooting percentages, as compared to epicotyls explants. Explants of the epicotyl and hypocotyl induced multiple shoots (7-8) in culture medium supplemented with 10.0 μM de BAP on the third subculture. The addition of 0.5 μM IBA or NAA, combined with BAP concentrations did not influence regenerations rates. IBA pulse treatment (10.0 mM) during 15 minutes induced higher rooting percentages (80%). Plantlets planted in a climatized greenhouse showed higher survival rates (90%). Somatic embryo induction occurred from mature and immature embryos inoculated on semi-solid culture media (LPm, WPM and MS), supplemented with 2,4-D (5.0 or 10.0 μM) plus Kin, TDZ or BAP (0.5 μM) at dark conditions. The induction and expression of primary cultures occurred asynchronously and in relatively small proportions of cultures. Direct and indirect patterns of somatic embryogenesis were observed depending of the physiological stage of the explants. The establishment and scale-up of embryogenic cell lines occurred in LPm culture medium, supplemented with 2,4-D or NAA (0.5 μM) plus Kin (0.5 μM) for periods longer than three years. Somatic embryos maturation occurred in LPm culture medium supplemented with 2-iP (12.30-24.60 μM) plus ANA (0.5 μM) or ABA (30 μM) to maturation of embryogenic cell lines. Cytochemical studies showed the accumulation of lipid and starch bodies in the embryogenic cells. Histological studies allowed characterization of embryogenic cells and of the stages of somatic embryos.

1 INTRODUÇÃO

A exploração intensiva de florestas no Brasil tem avançado do sul para o norte de nosso país, colocando em risco de extinção muitas espécies e populações existentes. O conhecimento insuficiente da biologia das espécies, do seu potencial para diferentes usos e da variabilidade genética existente entre e dentro das populações vêm levando à perda irreversível de recursos genéticos dessas espécies, antes que esses estudos ao menos tenham sido realizados (KAGEYAMA e DIAS, 1982).

O ritmo de desmatamento tem sido maior nas florestas de regiões tropicais e considerando a fragilidade desses ecossistemas, deve ser dada prioridade à conservação nos trópicos, onde áreas protegidas são escassas e menos eficientemente cuidadas (KAGEYAMA, 1987). O Estado do Paraná é um exemplo de uma devastação incontrolada, com interesses exclusivamente econômicos. A cobertura vegetal de 16.782.400 ha, em 1500, perfazia o equivalente a 84,72% da área total do Estado. Com o ciclo da madeira, chegou-se à reduzida taxa de 8,93%, ou seja, apenas 1.769.449 ha de formações florestais no Estado do Paraná (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/ INPE/ISA, 1998).

Há poucas alternativas para formação de florestas artificiais com espécies nativas para abastecer o atual e futuro mercado interno e externo com madeira de lei, tão importante para a economia de uma nação. O plantio de espécies exóticas supre o mercado em alguns usos, tais como papel, celulose, carvão, lenha e resina.

As principais causas da extinção da Floresta Paranaense são a agricultura, pecuária, construção de hidrelétricas, extração madeireira, extração de plantas medicinais, extração para fins alimentícios e expansão urbana (HATSCHBACH e ZILLER, 1995).

A peroba-rosa é uma espécie nativa de importância econômica que corre perigo de extinção e necessita com urgência de um programa de conservação genética, sendo recomendada para pesquisa nas regiões bioclimáticas 3 e 4 no zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná (INOUE *et al.*, 1984; EMBRAPA, 1986; CARVALHO, 1994). Essa espécie se encontra na lista para conservação *ex situ* e *in situ* no Brasil e na Venezuela, onde é considerada muito ameaçada no Estado de Zulia (CARVALHO, 1994). Segundo BRUNE e MELCHIOR (1976), algumas espécies das florestas da Venezuela, tais como *A. polyneuron*, têm sofrido uma redução dos recursos genéticos, pela perda de procedências, causada pela exploração e transformação de áreas florestais para o uso na agricultura. HATSCHBACH e ZILLER (1995) enquadraram a peroba-rosa como espécie rara da Floresta Estacional Semi-Decidual na lista de plantas

ameaçadas de extinção no Estado do Paraná. A peroba-rosa foi recomendada para reposição de mata ciliar em locais com ausência de inundação (CARVALHO, 1994).

Avaliações realizadas comparando o plantio de peroba-rosa de duas procedências confirmaram o não cosmopolitismo da espécie, ou seja, ela se comporta diferente conforme a origem e o local onde é cultivada (NOGUEIRA e SIQUEIRA, 1976). GURGEL FILHO *et al.* (1982), estudando a silvicultura de espécies nativas, constataram que a peroba-rosa apresenta grande heterogeneidade do material básico, sendo imprescindível o melhoramento genético. Segundo CARVALHO (1994), essa é uma das espécies madeireiras com silvicultura pouco conhecida.

A peroba-rosa apresenta sérias dificuldades de propagação devido a frutificação ser irregular, sendo produzidas grandes quantidades de sementes a cada quatro anos, a coleta de sementes é difícil e a germinação irregular. O crescimento lento e a dificuldade no enraizamento de estacas são alguns dos problemas que impedem a reposição de espécies nativas (CARVALHO, 1994).

A maioria das árvores florestais são propagadas por sementes. As sementes de genótipos superiores são produzidas em pomares de sementes. Os pomares de sementes, por sua vez, apresentam um longo ciclo para a sua formação, que de um modo geral levam de 20 a 30 anos para produzirem grandes quantidades de sementes para reflorestamento (AHUJA, 1993). O longo ciclo de regeneração, a grande dimensão das árvores e a produção esporádica de sementes são obstáculos para os programas de melhoramento florestal (GROSSNICKLES *et al.*, 1996).

Um dos métodos para maior produtividade das florestas é a propagação vegetativa de indivíduos superiores. As características dos indivíduos a serem multiplicados podem apresentar variações dependendo da aplicação comercial; no entanto, as seguintes características são desejáveis: alta taxa de crescimento, resistência a pragas e doenças, qualidade de madeira desejável (comprimento de fibra e gravidade específica), responsiva às práticas silviculturais (adubação e tolerância a variações ambientais extremas) e boa forma, ou seja, caule pesado com ramificação fina para madeira serrada (DURZAN e CAMPBELL, 1974).

Uma estratégia básica no melhoramento de árvores é a captura de ganhos genéticos obtidos pelas técnicas de micropropagação (GUPTA *et al.*, 1991). A micropropagação de plantas oferece um conjunto de técnicas que possibilitam a propagação massal de genótipos selecionados. A aplicação destas técnicas é dependente de aspectos associados a indução e

controle da morfogênese *in vitro* em suas duas rotas preferenciais: organogênese e embriogênese somática.

A organogênese é a técnica *in vitro* mais empregada quando se deseja a propagação clonal de espécies lenhosas. A embriogênese somática ainda apresenta algumas limitações que merecem atenção especial: alguns genótipos apresentam dificuldades na indução e desenvolvimento de embriões somáticos ou nas etapas de maturação, conversão dos embriões somáticos e no desenvolvimento de plântulas somáticas viáveis. Segundo HANDLEY (1995), a embriogênese somática não é simplesmente uma técnica utilizada para estudar a totipotência e os processos fundamentais da morfogênese. A embriogênese somática tem potencial para multiplicar milhões de plantas de espécies florestais, sendo que as taxas de multiplicação de culturas embriogênicas ultrapassam às atingidas em outros sistemas de regeneração *in vitro* e em sistemas de propagação convencionais. Os embriões somáticos podem se desenvolver em meios líquidos, onde ocorre a produção em grande escala de embriões nos biorreatores. Por exemplo, estima-se que em um litro de cultura embriogênica de coníferas podem existir aproximadamente 100.000 embriões somáticos. Os embriões somáticos podem ser encapsulados para produzir sementes sintéticas ou artificiais, que podem ser armazenadas ou plantadas como sementes (AHUJA, 1993; MERKLE *et al.*, 1995). Na área florestal, a tecnologia de semente sintética permite a produção de embriões somáticos durante o ano inteiro e reduz o risco para espécies em que a produção de sementes é limitada e assincrônica (GUPTA *et al.*, 1991). Segundo VICIENT e MARTINEZ (1998), além da aplicação dos embriões somáticos como sementes sintéticas e no melhoramento das culturas, o uso de embriões somáticos é de interesse especial na preservação de germoplasma e produção de metabólitos *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo final o estudo da morfogênese *in vitro* de *Aspidosperma polyneuron* visando determinar os fatores que induzem e controlam a organogênese e embriogênese somática para estabelecimento de um protocolo de micropropagação desta espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A- Determinar uma metodologia para instalação de culturas assépticas;
- B- Testar diferentes concentrações de fitorreguladores para as etapas de obtenção de brotações múltiplas e enraizamento;
- C- Testar diferentes tipos de explantes para iniciação de culturas embriogenéticas;
- D- Avaliar o tempo necessário de permanência em meio de cultura suplementado com 2,4-D para indução de embriões somáticos;
- E- Definir a melhor combinação de formulação salina e de fitorreguladores para a indução e desenvolvimento de embriões somáticos;
- F- Determinar os fatores que controlam a indução, manutenção, multiplicação, maturação e conversão dos embriões somáticos;
- G- Estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular, manutenção, multiplicação e maturação de linhagens celulares embriogenéticas;
- H- Estudar aspectos estruturais e citoquímicos das células embriogenéticas, massas pró-embriogenéticas e embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento;
- I- Determinar um método eficiente de aclimatização e transplântio de mudas para aumentar a sobrevivência em casa de vegetação e no campo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg.

A espécie estudada no presente trabalho pertence a família Apocynaceae e é conhecida popularmente como peroba-rosa.

Trata-se de uma espécie característica da Floresta Estacional Semidecidual, na formação submontana. A floresta situada em solos provenientes do Arenito Caiuá do oeste e noroeste do Paraná e do sudeste do Mato Grosso do Sul foi dominada pela *A. polyneuron* que perfazia aproximadamente 30 a 60% da cobertura do estrato emergente. Também encontrada na Floresta Estacional Decidual, em menor escala na Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) no sul do Paraná, na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Amazônica) no extremo noroeste de Mato Grosso e esporadicamente no Pantanal (CARVALHO, 1994).

No Brasil, a peroba-rosa ocorre nos seguintes Estados: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Rondônia, São Paulo e no Paraná (norte, noroeste, oeste e centro-sul, onde é rara) (CARVALHO, 1994).

A peroba-rosa caracteriza-se por apresentar tronco comprido, levemente tortuoso e cônico, casca extremamente grossa, grisácea, castanho-grisácea até parda, densa e profundamente fissurada em sulcos tortuosos e profundos, cerne róseo, ramificação cimosas, esgalhamento tortuoso e grosso, formando copa larga, folhagem verde-escura, folhas pequenas, lanceoladas ou espatuladas (FIGURA 15A). Os frutos são do tipo folículo elipsóide, séssil, achatado, lenhoso, com 2,5 a 6,0 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura, pardo-escuro, densamente coberto de lenticelas esbranquiçadas e bem visíveis (FIGURAS 15B e 15C). Os frutos podem conter de uma a quatro sementes, elípticas, aladas, com 2 a 4 cm de comprimento por 1 cm de largura (FIGURA 15D). Embrião axial, invaginado (0,9 x 0,7 x 0,1 cm), cotilédone foliáceo, sagitado, cor branca; às vezes 2, 3, 4 embriões por semente (poliembria) (FIGURA 15E).

A peroba-rosa apresenta frutos maduros de junho a novembro. É comum haver anos sem frutificação, sendo produzidas grandes quantidades de sementes apenas a cada dois a quatro anos. A floração e frutificação tem início aos 20 anos de idade, em plantios (CARVALHO, 1994). A duração do período de maturação do fruto é de dois meses (PINA-RODRIGUEZ e AGUIAR, 1993). Os frutos da peroba-rosa dispersam as suas sementes quase imediatamente após a modificação da coloração, do verde para o marrom escuro e devem ser coletados antes da dispersão para evitar a perda de sementes (PASZTOR, 1963). A coleta dos

frutos geralmente é trabalhosa, devido a altura das árvores, sendo necessário o uso de cinto de segurança e esporões para subir à copa da árvore, procedendo-se assim a coleta com o uso de podões ou ganchos metálicos (CARVALHO, 1994). Segundo PINA-RODRIGUEZ e AGUIAR (1993), a coloração dos frutos não tem sido um índice eficiente para muitas espécies, como por exemplo a peroba-rosa. Talvez por ser anemocórica, a coloração não teria evolutivamente grande importância na atração do seu dispersor, não havendo sincronismo, portanto, entre o desenvolvimento do fruto e da semente. Em um quilograma de frutos tem-se em média 11 mil sementes que germinam em cerca de 16 dias, não havendo necessidade de quebra de dormência e apresentam um potencial germinativo entre 35 e 70% (INOUE *et al.*, 1984; SILVA *et al.*, 1993; CARVALHO, 1994).

SOUZA e MOSCHETA (1992) estudando a morfo-anatomia do fruto e da plântula de peroba-rosa constataram que a semente apresenta poliembrião, observando comumente um embrião mais desenvolvido e outros menores, que mostram, além da diferença em tamanho, estágio de desenvolvimento variável. O estudo de sementes imaturas de espécimes coletados em meses e locais diferentes, mostrou variação no número de embriões. Os autores constataram ainda, que a poliembrião observada nas sementes de peroba-rosa não foi registrada na literatura para a família Apocynaceae ou para o gênero *Aspidosperma* e ainda não se investigou a origem destes embriões adicionais.

A *A. polyneuron* caracteriza-se por apresentar madeira pesada (0,70 a 0,89g/cm³), alburno amarelado quando exposto ao sol e cerne variando do róseo amarelado ao amarelo queimado, levemente rosado, mais freqüentemente vermelho-rosado, uniforme ou com raios ou manchas escuras (CARVALHO, 1994).

A peroba-rosa demonstrou ser uma das melhores madeiras por sua resistência mecânica e resistência à decomposição (SANTOS, 1987). Pode substituir a madeira de teca (*Tectona grandis*) na construção naval, porque depois da mesma é a madeira que menos oxida os metais com que esteja em contato (CARVALHO, 1994).

Apresenta madeira de excelente qualidade, muito usada na indústria de móveis e em construção civil como caibros, ripas, forros, marcos de portas e janelas, venezianas, portões, rodapés, molduras, tábuas; construção naval e canoas (o tronco todo), esquadrias, obras externas, construção de vagões, móveis escolares, carrocerias, cabo de ferramentas, produção de folhas faqueadas e parquê. É de uso quase irrestrito em carpintaria, para a fabricação, entre outros objetos, de vigas, escadas, tacos e também móveis pesados. Em obras expostas tem grande aplicação como dormentes, não tanto pela durabilidade natural dos mesmos, que é em

média de seis anos, mas pela relativa facilidade de aquisição, trabalhabilidade e pela fixação de pregos principalmente (RIZZINI, 1971; INOUE *et al.*, 1984; CARVALHO, 1994).

3.2 MORFOGÊNESE *IN VITRO*

A maioria das células vegetais crescem, se diferenciam e se especializam constituindo estruturas com funções específicas. Todas as células vivas de uma planta têm a capacidade de reproduzir um organismo inteiro, ou seja, de expressar a sua totipotência, desde que possuam toda a informação genética necessária. Algumas células constituem uma planta e adquirem capacidade de regeneração, outras perdem a capacidade de regeneração e outras morrem (HARTMANN *et al.*, 1997). Numa planta também existem células altamente especializadas que nunca passaram por mudanças no seu estado de diferenciação. Provavelmente essas células não adquiriram ou perderam a capacidade de formar novas plantas (GEORGE, 1993). Segundo DE KLERK *et al.* (1997), provavelmente, as células programadas para cada rota de regeneração *in vitro* já existem no explante original. As células vegetais capazes de regenerar uma planta completa são totipotentes; no entanto, também existem determinadas células que formam somente um órgão e não uma planta com meristema apical caulinar e radicial, sendo essas células denominadas de multipotentes.

A morfogênese envolve crescimento e diferenciação. O termo crescimento é aplicado às mudanças quantitativas que ocorrem durante o desenvolvimento e pode ser definido como mudanças irreversíveis no tamanho de uma célula, órgão ou organismo inteiro. Entretanto, durante o desenvolvimento também ocorrem alterações qualitativas entre células, tecidos e órgãos às quais se aplica o termo diferenciação (WAREING e PHILLIPS, 1981). Células e tecidos que já foram programados para determinada função ou rota específica de desenvolvimento podem ser reprogramados para outras rotas diferentes (THORPE, 1994). Células altamente diferenciadas ou especializadas também podem ser estimuladas a reverter para uma forma mais embrionária, ou seja, as células podem sofrer desdiferenciação (HOPKINS, 1995) e esse termo pode ser definido como retomada da divisão celular e também refere-se a uma reprogramação gênica nessas células (WAREING e PHILLIPS, 1981; EMONS, 1994).

De uma forma geral, a morfogênese ocorre mediada por divisões e especializações celulares, no entanto, não se sabe ao certo porque determinada célula se divide em determinado tempo e lugar e especializa-se em uma célula diferenciada (GUERRA *et al.*, 1999). Um dos maiores problemas encontrados pelos morfogeneticistas vegetais é elucidar os

mecanismos pelos quais as células derivadas de células meristemáticas ou parenquimáticas se especializam em diferentes tipos de células e tecidos nos estágios sucessivos de desenvolvimento (WAREING e PHILLIPS, 1981).

A morfogênese *in vitro* compreende vários processos complexos e sequenciais que resultam da manipulação experimental do explante e finalizam com a obtenção de uma planta completa (HICKS, 1980). As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam estudar melhor alguns processos da morfogênese, bem como os fatores intrínsecos e extrínsecos responsáveis pela indução e expressão de rotas morfogenéticas, pois permitem simplificação do material experimental que pode ser uma célula, tecido ou órgão, em comparação com o organismo inteiro (THORPE e KUMAR, 1993).

Os conceitos de competência, determinação e indução celular vêm sendo utilizados pelos fisiologistas vegetais para um melhor entendimento dos processos que controlam a morfogênese *in vitro* (AMMIRATO, 1985). O termo competência celular é empregado para células que retêm a capacidade de diferenciação ou morfogênese ou adquiriram-na em resposta a um estímulo apropriado, ou seja, é a capacidade das células de reagirem a sinais específicos do desenvolvimento: ambientais, químicos ou de tratamentos de manipulações (AMMIRATO, 1985; GEORGE, 1993; YEUNG, 1995; GUERRA *et al.*, 1999). Determinação celular é o processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma determinada célula ou tecido torna-se limitado a uma rota específica de diferenciação (AMMIRATO, 1985). A indução ocorre quando um sinal produz uma única resposta de desenvolvimento no tecido competente (YEUNG, 1995). Indução é uma alteração na competência de células específicas (indução diretiva) ou um estímulo de uma resposta de desenvolvimento específica a partir de um tecido competente (indução permissiva) (AMMIRATO, 1985). Epigênese é definida como ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular) envolvendo células receptivas ou tecidos responsivos (GUERRA *et al.*, 1999).

A morfogênese de células que já foram programadas para o desenvolvimento é denominada de permissiva e a morfogênese indutiva ocorre quando as células são induzidas a se tornarem morfogênicas por reguladores de crescimento endógenos ou exógenos. Morfogênese permissiva e indutiva podem ser consideradas sinônimos de morfogênese direta e indireta (GEORGE, 1993).

Na primeira etapa da morfogênese, células desdiferenciadas se tornam competentes para determinado tipo de desenvolvimento. A etapa seguinte é a de determinação celular,

onde uma célula ou um grupo de células segue uma rota específica de desenvolvimento programada geneticamente, sem sofrer interferência dos reguladores de crescimento (CHRISTIANSON, 1987). Geralmente, a determinação resulta em células diferenciadas que mantêm o mesmo estado de determinação das suas células parentais, de modo que o estado de diferenciação é copiado durante a divisão celular. Quando a determinação morfogenética ou diferenciação celular é fixada ou irreversível ocorre uma canalização do desenvolvimento. Com a canalização as células vão seguir uma rota específica de desenvolvimento, ao menos que elas sejam estimuladas a se dividir, promovendo um crescimento desdiferenciado (GEORGE, 1993). Segundo CHRISTIANSON (1985), não há dúvidas que os estados de competência e determinação ocorrem nas plantas superiores; no entanto, ainda não está bem esclarecido se esses estados ocorrem a nível de células individuais. Competência e determinação são estados do desenvolvimento que são definidos e avaliados pelas respostas das células e tecidos a estímulos externos. Na prática, muitas vezes se torna difícil a separação da competência e da determinação (GEORGE, 1993).

A programação das células pode sofrer modificações ocasionadas pelo ambiente *in vitro*, especificamente, quando ocorre uma alteração da disponibilidade dos reguladores de crescimento das plantas. Para a morfogênese se expressar é necessário que as células sejam competentes para responder às substâncias químicas reguladoras do crescimento. Os prováveis fatores internos que controlam a competência são os níveis endógenos de reguladores de crescimento do explante no início do cultivo e a capacidade das células de sintetizar essas substâncias de crescimento ou metabólitos essenciais (GEORGE, 1993). A indução da morfogênese depende do efeito combinado do meio de cultura (competência) e da presença de um balanço correto de reguladores de crescimento (determinação). A competência pode ser adquirida em meios de cultura com ou sem reguladores de crescimento (GEORGE, 1993).

Os sinais morfogenéticos determinam as condições que as células competentes iniciam um programa de diferenciação que é controlado intrinsecamente. Esse programa resulta da ação seletiva de genes associada com os processos celulares subsequentes de replicação, transcrição e tradução, ocasionando mudanças biofísicas, bioquímicas e de metabolismo nas células-alvo, seguida de eventos citológicos e histológicos que estão associados com a formação de um órgão ou embrião (CHRISTIANSON e WARNICK, 1985). Em cada caso, o processo de desenvolvimento organizado inicia com mudanças nas células, ocasionadas em resposta a algum (ns) sinal (is) indutivo (s) que faz com que as células iniciem a proliferação

celular ou uma rota de diferenciação. Essas células devem ter a capacidade de desdiferenciação e de interação celular. As células vão sofrer divisões celulares e formarão um meristemóide ou uma célula pró-embriogenética e posteriormente um primórdio de raiz ou parte aérea, ou um embrião, respectivamente (THORPE, 1994). Segundo DE KLERK *et al.* (1997), as rotas de regeneração apresentam semelhanças e consistem de três fases: 1- desdiferenciação (o tecido se torna competente para responder a um estímulo organogênico ou embriogênico), 2- indução (as células se tornam determinadas para formar raiz, parte aérea ou embrião) e 3- realização (formação de um órgão ou embrião). A primeira fase pode envolver um período de crescimento de calo (regeneração indireta), apesar de freqüentemente, as células dos explantes se tornarem competentes na ausência ou após pouca atividade de divisão celular (regeneração direta) e somente algumas células apresentam resposta organogênica ou embriogênica num determinado explante. Provavelmente, o estímulo hormonal para a fase de desdiferenciação é auxina; durante a fase de indução, cada rota necessita de estímulos hormonais específicos e na fase de realização os hormônios devem ser adicionados em baixas concentrações ou ausentes.

Estudos do desenvolvimento utilizando técnicas *in vitro* vêm sendo realizados baseados nas pesquisas clássicas de manipulações hormonais de SKOOG e MILLER (1957) que estimularam a formação de brotações e raízes em cultura de fumo e de STEWARD *et al.* (1958) e REINERT (1958) do surgimento de embriões somáticos, a partir de células somáticas de cenoura. Esses estudos pioneiros estabeleceram modelos básicos de tratamentos e manipulações de meios de cultura, determinando rotas de desenvolvimento organogênicas e embriogênicas. As rotas de desenvolvimento em cultura apresentam um grau elevado de plasticidade. Geralmente, as células se tornam programadas para seguir uma determinada rota organogênica ou embriogênica. Um tratamento específico origina apenas brotações, ou raízes ou embriões, sendo que as condições devem ser alteradas quando forem desejados outros órgãos (AMMIRATO, 1985).

Como já foi citado anteriormente, as manipulações de reguladores de crescimento e das condições ambientais permitem que ocorra uma determinada rota morfogenética *in vitro*. Na organogênese, alterações nas concentrações de citocininas e auxinas podem promover crescimento de calo desorganizado, formação de gemas ou de raízes. Na embriogênese somática, meios de cultura com concentrações elevadas de auxinas e nitrogênio reduzido suficiente são essenciais para indução de embriões somáticos. Se pró-embriões e células embriogênicas forem mantidos em meios basais com concentrações elevadas de auxinas, eles

poderão continuar produzindo células e pró-embriões. Por outro lado, uma redução ou omissão no suprimento de auxina estimula a maturação dos embriões somáticos (AMMIRATO, 1985).

3.3 SISTEMAS DE PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

Cultura de tecido é um termo empregado para vários procedimentos que são utilizados para manutenção e crescimento de células, tecidos e órgãos de plantas em cultura asséptica (ou *in vitro*). Essas técnicas são utilizadas para a propagação e modificação de genótipos (melhoramento de plantas), produção de biomassa de produtos bioquímicos secundários, preservação de germoplasma e investigações científicas. Essas atividades estão incluídas no termo biotecnologia (GEORGE, 1993; HARTMANN *et al.*, 1997). No escopo da biotecnologia, micropropagação designa as técnicas de propagação massal *in vitro* de plantas (HARTMANN *et al.*, 1997).

As bases da micropropagação remontam aos estudos clássicos de SKOOG e MILLER (1957), os quais demonstraram que a organogênese resultava de interações quantitativas entre reguladores de crescimento, particularmente auxinas e citocininas, e outros metabólitos (THORPE, 1994). Depois disto, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para identificar os fatores que controlam a morfogênese vegetal (TRAN THANH VAN, 1981; LAKSHMANAN *et al.*, 1997).

Dependendo do explante utilizado e da sua manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por meio de multiplicação de gemas axilares, de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e por embriogênese somática direta ou indireta. Os processos indiretos passam por uma fase intermediária de calo (GEORGE, 1993).

3.4 ORGANOGÊNESE

A organogênese *in vitro* envolve seqüências complexas de desenvolvimento que resultam da manipulação experimental de partes de uma planta. Estas seqüências podem ocorrer em diferentes tipos de explantes e terminam com a formação de órgãos diferenciados ou plantas inteiras (HICKS, 1980). Na maioria dos casos não se conhece a natureza dos eventos iniciais da organogênese. Em alguns tecidos ocorre maior atividade de divisão celular, onde formam-se pró-meristemóides constituídos por pequenas células isodiamétricas, com núcleos proeminentes e citoplasma denso. Esses pró-meristemóides são inicialmente plásticos e podem originar primórdios radiciais ou caulinares (THORPE, 1980).

Os primeiros eventos da organogênese podem ocorrer em fases baseados nas respostas dos explantes em cultura. Essas fases são: 1- obtenção de competência ou fase de pré-indução; 2- indução ou fase de determinação e 3- fase de expressão. Uma vez que as células se tornam competentes, elas podem ser induzidas a seguir determinada rota morfogênica. Essa indução da organogênese ocorre por meio de estímulos externos, tais como: reguladores de crescimento no meio de cultura e/ou um balanço entre níveis exógenos e endógenos dessas substâncias reguladoras. Entretanto, algumas espécies não respondem a esses balanços de reguladores de crescimento, de modo que não ocorre a formação de brotações ou raízes *in vitro*. Nessas condições, essas culturas não adquiriram competência para organogênese. É necessário que ocorra desdiferenciação celular, interação celular e reação a sinais específicos. Os estados de competência e indução (ou determinação) nem sempre ocasionam mudanças morfológicas no explante e só podem ser observados por manipulações experimentais (CHRISTIANSON e WARNICK, 1985; THORPE e KUMAR, 1993)

MURASHIGE (1974) determinou três estágios para a multiplicação de plantas *in vitro*: 1- estabelecimento de culturas assépticas; 2- multiplicação de propágulos; 3- preparo para estabelecimento das plantas no solo. Alguns anos mais tarde, pesquisadores sugeriram que fosse incluído o estágio inicial de preparo de plantas matrizes e propuseram que a micropropagação fosse realizada em cinco estágios: 0- preparo de plantas matrizes; 1- início da cultura; 2- multiplicação; 3- alongamento, indução e desenvolvimento de raízes e 4- transferência para condições de casa de vegetação (DEBERGH e MAENE, 1981).

3.4.1 Estágio 0 - Seleção e preparo de plantas matrizes

As plantas que crescem num ambiente externo são contaminadas com microorganismos que se encontram principalmente nas superfícies externas das plantas. Muitos tipos de microorganismos, particularmente, bactérias e fungos competem com o crescimento do material vegetal *in vitro*. As plantas matrizes devem ser mantidas em locais apropriados, como casas-de-vegetação e estufas, para reduzir a contaminação. A percentagem de contaminação superficial das plantas matrizes crescendo em casa-de-vegetação, sob condições controladas, é, geralmente, menor do que quando comparadas com as plantas crescendo no campo. Além disso, as plantas selecionadas devem ser vigorosas e não devem apresentar sintomas de doenças (GEORGE, 1993).

MURASHIGE (1974) selecionou alguns fatores importantes que devem ser considerados para seleção dos explantes: o órgão utilizado como fonte de explantes, a sua

idade fisiológica e ontogenética, a estação do ano no qual o explante é obtido, o tamanho do explante e a qualidade da planta matriz doadora dos explantes.

A principal vantagem da manipulação de árvores Angiospermas *in vitro* é a grande variedade de materiais que podem ser utilizados como explantes. Esses incluem: sementes, partes de plântulas, folhas, gemas, brotações de árvores juvenis e maduras, partes florais e raízes (HARRY e THORPE, 1994). Em plantas lenhosas, os tecidos juvenis, como por exemplo: brotações de árvores podadas, embriões zigóticos ou partes de plântulas (epicótilos, hipocótilos e cotilédones) são considerados os melhores explantes para o cultivo *in vitro* (AHUJA, 1993). Segundo THORPE e KUMAR (1993), alguns estudos indicaram que tecidos provenientes de meiose, como anteras e partes de plântulas têm maior capacidade de regeneração *in vitro*, indicando que a meiose, provavelmente remove alguns bloqueios epigenéticos de regeneração dos tecidos vegetais adultos.

A retirada de explantes deve ser feita de preferência a partir de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, após o final da fase de dormência, durante a primavera e verão. As brotações retiradas de árvores na fase adulta têm relativamente pouca capacidade para micropropagação, e para superar este obstáculo há necessidade de tratamentos de rejuvenescimento, tais como: poda, enxertos de brotações de árvores mais velhas em porta-enxertos juvenis, pulverização das plantas com citocininas e subcultivos sucessivos dos explantes *in vitro* (BONGA, 1987).

O tipo e a frequência de morfogênese também depende da posição original do explante dentro da planta, de modo que a capacidade de regeneração das brotações aumenta à medida que aumenta a distância do ápice da planta matriz (AMMIRATO, 1985). Segundo DEBERGH e READ (1991), tanto os segmentos nodais dos ramos, como as brotações apicais podem ser utilizadas como explantes primários e isso foi constatado para *Quercus petraea* (SAN-JOSE *et al.*, 1990). Para algumas espécies, como *Castanea sativa* (SANCHEZ *et al.*, 1997), os segmentos nodais apresentaram taxas médias de regeneração mais elevadas do que as brotações apicais. Para outras espécies, somente as brotações apicais possibilitaram o estabelecimento dos explantes *in vitro* e a regeneração de brotações, como por exemplo: *Eucalyptus microcorys*, *Banksia serrata* e *B. oblongifolia* (NICCOL *et al.*, 1994), *Fagus sylvatica* (MEIER e REUTHER, 1994) e *Quercus robur* (VIEITEZ *et al.*, 1985). ELLIS *et al.* (1991) compararam a posição dos explantes em relação à taxa média de regeneração de brotações de *Picea glauca* e constataram que com segmentos do hipocótilo, a taxa de sobrevivência foi muito baixa, além de muitos formarem calos.

3.4.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas

Antes de iniciar uma cultura *in vitro* é necessário a utilização de desinfestantes químicos para remover os microorganismos. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é muito utilizado para desinfestações e a sua concentração pode variar entre 0,25 a 2% v/v, dependendo do material vegetal e do período pelo qual o tecido é exposto (GEORGE, 1993). O bicloreto de mercúrio (HgCl_2) tem se mostrado eficiente para muitas espécies; no entanto, por apresentar alta toxicidade para os seres humanos e riscos de contaminação ambiental, esse produto deve ser utilizado com cautela (GEORGE, 1993). A concentração e o tempo de exposição dos desinfestantes são fatores importantes que dependem do material vegetal utilizado e diferentes partes de uma planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade das soluções desinfestantes. Outros fatores determinantes para a escolha do tipo de tratamento de desinfestação são a idade da planta matriz ou do explante, a época e o local de coleta (GEORGE, 1993).

Quando sementes são utilizadas como explantes, elas devem ser desinfestadas antes da remoção dos embriões para a germinação asséptica. As árvores tropicais apresentam um alto grau de contaminação natural e, geralmente, utiliza-se uma combinação de HgCl_2 , NaOCl e etanol. Os procedimentos de desinfestação são modificados de acordo com o tamanho das sementes, a espessura dos tegumentos das sementes, dependendo do modo de coleta e armazenamento, a presença ou ausência de apêndices nos tegumentos e a região geográfica de origem das sementes (GEORGE, 1993). As sementes, geralmente, são fáceis de desinfestar, facilitando assim, a sua utilização em trabalhos experimentais de cultura de tecidos. Sementes com tegumentos rígidos suportam altas concentrações dos desinfestantes por um período maior do que outros tipos de explantes. Após a desinfestação, elas germinam e crescem num meio de cultura simples, isento de reguladores de crescimento e produzem plântulas livres de contaminação que podem ser utilizadas como explantes. Entretanto, as sementes apresentam a desvantagem de serem resultado da reprodução e os seus tecidos podem ser geneticamente diferentes dos seus parentais (GEORGE, 1993).

Alguns exemplos de tratamentos de desinfestação com HgCl_2 e NaOCl em espécies lenhosas podem ser observados na tabela 1.

TABELA 1. DESINFESTAÇÃO DE ESPÉCIES LENHOSAS COM HgCl₂ E NaOCl.

MATERIAL	ESPÉCIE	TRATAMENTO	AUTOR(ES)
Sementes	<i>Ulmus carpinifolia</i>	1% HgCl ₂ 20 min.	MEZETTI <i>et al.</i> (1988)
Sementes	<i>Dalbergia latifolia</i>	0,1 % HgCl ₂ 15 min.	RAI e CHANDRA (1989)
Brotações e segmentos nodais	<i>Carpinus betulus L.</i> <i>Fraxinus excelsior L.</i>	0,1 % HgCl ₂ 20 a 40 min.	CHALUPA (1990)
Sementes	<i>Cajanus cajan</i>	0,1 % HgCl ₂ 5 min.	PRAKASH <i>et al.</i> (1994)
Sementes	<i>Nepenthes khasiana</i>	etanol 70% 3 min. 0,1% HgCl ₂ 15 min.	LATHA e SEENI (1994)
Segmentos nodais	<i>Hemidesmus indius</i>	0,1 % HgCl ₂ 5-6 min.	PATNAIK e DEBATA (1996)
Segmentos nodais	<i>Wrightia tomentosa</i>	0,1 % HgCl ₂ 5 min.	PUROHIT <i>et al.</i> (1994)
Semente	<i>Grevillea robusta</i>	0,1 % HgCl ₂ 10 min.	RAJASEKARAN (1994)
Brotações de plântulas	<i>Cleistanthus collinus</i>	0,15% HgCl ₂ 10 min.	QURAISHI <i>et al.</i> (1996)
Sementes	<i>Sterculia urens</i>	0,1% HgCl ₂ 15 min.	PUROHIT e DAVE (1996)
Segmentos nodais	<i>Quercus shumardii</i>	0,5% NaOCl 15-20 min. etanol 70% 1 min.	BENNETT e DAVIES JR. (1986)
Sementes	<i>Fraxinus americana</i>	1% NaOCl 20-30 min.	MOURA e CARNEIRO (1992)
Segmentos nodais	<i>Miscanthus sinensis</i>	1,5 % NaOCl 20 min.	NIELSSEN <i>et al.</i> (1993)
Sementes	<i>Fraxinus angustifolia</i>	2,4% NaOCl 30 min.	PEREZ-PARRON <i>et al.</i> (1994)
Segmentos nodais	<i>Maytemus ilicifolia</i>	0,25% NaOCl 30 min.	PEREIRA <i>et al.</i> , (1995)
Segmentos nodais	<i>Cercis canadensis</i>	0,5 % NaOCl 15 min.	MACKAY <i>et al.</i> (1995)

3.4.2.1 Meio de cultura

Uma grande variedade de meios de cultura vem sendo utilizada para diferentes espécies, apesar da formulação salina do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com concentrações relativamente altas de macronutrientes e micronutrientes, ainda ser a mais utilizada para as Angiospermas (GEORGE, 1993). O estímulo de crescimento e desenvolvimento de células e tecidos no meio basal MS é devido a sua concentração elevada de nitrato de amônio, quando comparada com outras formulações salinas. O meio MS contém 40 mM de NO₃⁻ e 20 mM de NH₄⁺ (GEORGE, 1993). Com algumas espécies lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostrou satisfatório e composições mais diluídas em macronutrientes como o meio “woody plant medium” (WPM) (LLOYD e MC. COWN, 1980) tem sido utilizado com sucesso. A formulação salina WPM apresenta na sua composição uma menor concentração de nitrogênio e potássio e uma menor força iônica total (HARRY e THORPE, 1994). Para espécies, como: *Quercus shumardii* (BENNETT e DAVIES JR.,

1986), *Picea glauca* (ELLIS *et al.*, 1991), *Grevillea robusta* (RAJASEKARAN, 1994), *Cornus florida* (DECLERCK e KORBAN, 1994), *Alnus cremastogyne* (TANG *et al.*, 1996), *Nothofagus alpina* (JORDAN *et al.*, 1996), o meio de cultura WPM foi eficiente para todas as etapas da micropropagação; entretanto, para outras espécies como: *Fraxinus excelsior* (CHALUPA, 1990), *Fraxinus angustifolia* (PEREZ-PARRON *et al.*, 1994) e *Cercis canadensis* var. *mexicana* (MACKAY *et al.*, 1995), esse meio de cultura só foi utilizado na etapa de enraizamento.

3.4.2.2 Fitorreguladores

Nos organismos multicelulares é necessário que ocorra comunicação entre as células para regular a diferenciação e organização, controlar o crescimento, divisão e outras atividades diversas. Durante o desenvolvimento, quando os organismos se tornam mais complexos há necessidade de sistemas sinalizadores que operem à longas distâncias, permitindo assim, a comunicação entre as suas partes. Esses sistemas são hormonais e as células, tecidos e órgãos transmitem e detectam sinais de outras partes da planta ocasionando respostas fisiológicas (LIBBENGA e MENNES, 1995).

O conceito clássico de um hormônio vegetal definido por Went e Thimann (1937) como sendo uma substância produzida numa parte do organismo e transferida para outra parte influenciando um determinado processo fisiológico é inadequado para explicar a regulação hormonal do desenvolvimento das plantas. Os processos de desenvolvimento são influenciados por um controle hormonal múltiplo a nível fisiológico, bioquímico e molecular. Hormônios vegetais são uma classe importante de sinais internos que são facilmente transportados para as células-alvo e estão envolvidos diretamente no controle da transcrição e tradução de atividades dos genes em muitos processos das plantas. Os fitohormônios agem reconhecendo receptores específicos nas células responsivas que traduzem os sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos específicos. Esse controle hormonal múltiplo pode ser baseado em diferentes tipos de interações entre os hormônios, sendo que a regulação pode ser realizada por um balanço de hormônios, por efeitos opostos de hormônios, por alteração da concentração de um hormônio por outro, por alterações na sensibilidade de um hormônio e por ações sequenciais de diferentes hormônios. Segundo BARENDSE e PEETERS (1995), a aplicação exógena de hormônios afeta os níveis endógenos, sendo que a interpretação dos efeitos observados deve considerar a absorção, o metabolismo e a variação de efeitos secundários. Os órgãos e tecidos em desenvolvimento consistem de diferentes tipos

de células, de modo que muitos sistemas controle podem estar operando dentro desses tecidos ou órgãos.

Os hormônios vegetais não influenciam necessariamente as respostas das plantas, exclusivamente por mudanças na sua concentração, no entanto, a regulação hormonal também pode ser exercida por alterações na sensibilidade das células responsivas. A interação de dois hormônios pode fazer com que um hormônio mude a sensibilidade do outro, ocasionando uma resposta fisiológica (BARENDSE e PEETERS, 1995). Dessa maneira, a resposta a um determinado hormônio pode ser alterada por mudanças no número e na afinidade dos receptores e no nível de outras substâncias endógenas (FIRN, 1986; GUERRA *et al.*, 1999).

Muitas espécies responderam a um balanço adequado de citocininas e auxinas formando brotações e raízes, sendo que em 75% das espécies avaliadas foram utilizadas cinetina (Cin) ou 6-benzilaminopurina (BAP), em concentrações que variaram entre 0,05-46 μ M para indução de brotações múltiplas. Auxinas, tais como ácido indol-3-acético (AIA) e ácido naftalenoacético (ANA) foram utilizadas em concentrações que variaram entre 0,06 a 27 μ M. Em alguns casos, auxinas ou citocininas exógenas foram suficientes para organogênese (EVANS *et al.*, 1981; THORPE, 1994). Cin e BAP são citocininas comumente usadas, enquanto que isopenteniladenina (2-iP) e zeatina (ZEA) foram utilizadas com menor frequência por causa do seu custo elevado (THORPE e PATEL, 1984).

Níveis reduzidos de N-fenil-N'1,2,3-thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron, TDZ) e muitos outros compostos de fenilureia piridil têm demonstrado estimular a formação de meristemas e gemas *in vitro*. Esses compostos têm apresentado os mesmos efeitos das citocininas para muitas espécies (FELLMAN *et al.*, 1987). O TDZ tem tornado a micropropagação de muitas espécies lenhosas recalcitrantes viável. Baixas concentrações de TDZ (<1 μ M) podem induzir uma maior proliferação de gemas axilares, quando comparado com outras substâncias com atividade citocinínica; no entanto, pode inibir o alongamento das brotações. As concentrações superiores a 1 μ M de TDZ podem estimular a formação de calos, brotações adventícias ou embriões somáticos. Devido a sua alta atividade citocinínica e as respostas positivas obtidas por espécies lenhosas, o TDZ está entre as substâncias reguladoras mais ativas para a manipulação *in vitro* de muitas espécies lenhosas, sendo amplamente utilizado como um promotor de regeneração de brotações em cultura de tecido de plantas (HUETTEMAN e PREECE, 1993; HERMAN, 1997).

Explantos de algumas espécies lenhosas, especialmente árvores, apresentam um hábito de crescimento monopodial natural e não ramificam suficientemente *in vitro*, quando são

utilizadas citocininas amino purinas. O TDZ é uma alternativa que intensifica a produção de brotações dessas espécies. Entretanto, ele deve ser utilizado com cautela quando se deseja micropropagação clonal porque além de estimular a proliferação de gemas axilares, também estimula a formação de calos e de gemas adventícias. As concentrações de TDZ ou de outra substância com atividade citocinínica devem ser selecionadas para estimular somente o crescimento de brotações axilares que é essencial quando se deseja fidelidade clonal, tendo em vista que as brotações adventícias podem formar variantes somaclonais (HUETTEMAN e PREECE, 1993).

3.4.2.3 Ambiente de cultivo

Existem muitos aspectos do ambiente de cultivo, tais como: forma física do meio de cultura, pH, umidade, luz e temperatura, os quais podem influenciar o crescimento e desenvolvimento organizado (THORPE e PATEL, 1984).

3.4.3 Estágio 2: indução de brotações múltiplas

O principal objetivo desse estágio é produzir o maior número de brotações enraizáveis. Nas Angiospermas, as brotações estabelecidas em cultura são tratadas com citocininas (4,5 a 25 μM) para eliminar a dominância apical e aumentar a ramificação de gemas axilares das folhas (HU e WANG, 1983).

As citocininas constituem o grupo de compostos indispensável para a quebra de dominância apical e proliferação de gemas axilares. O tipo e a concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. A BAP têm se mostrado eficaz para promover a multiplicação de muitas espécies, em concentrações que variam entre 0,4 e 22,19 μM (GEORGE, 1993). Para algumas espécies, o meio de cultura pode ser suplementado com uma baixa concentração de auxina, além das citocininas. O ANA e o AIB são as substâncias com atividade auxínica freqüentemente usadas, em concentrações entre 0,01 e 0,5 μM , sendo que o seu efeito é de estimular o crescimento das brotações axilares (GEORGE, 1993).

Segundo DEBERGH e READ (1991), para muitas espécies, o método mais desejável de micropropagação é caulogênese adventícia porque aumenta rapidamente o número de brotações. Entretanto, para utilizar esse sistema tem que ser determinado se as brotações adventícias produzem plantas de mesma constituição genética da planta matriz. Os autores acrescentaram que as culturas originalmente produzem brotações axilares e essas produzem

muitas brotações adventícias após sucessivos subcultivos. Isso significa que o método de multiplicação de um sistema não é necessariamente fixado.

Alguns exemplos de taxas médias de regeneração de brotações obtidas com diferentes níveis de fitorreguladores testados para algumas espécies lenhosas são apresentados na tabela 2.

TABELA 2. OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS DE ESPÉCIES LENHOSAS.

EXPLANTE	ESPÉCIE	TRATAMENTO	TM	DIAS	AUTOR
segm. nodais	<i>Quercus shumardii</i>	WPM +8,89 μ M BAP	6,4	45	BENNETT e DAVIES JR (1986)
hipocótilo	<i>Dalbergia latifolia</i>	MS+ 4,44 μ M BAP	10,9	30	RAI E CHANDRA (1989)
segm. nodais	<i>Betula celtiberica</i>	MS+ 2,66 μ M BAP	20-50	20	PEREZ e POSTIGO (1989)
segm. nodais	<i>Carpinus betulus</i>	DKW+4,4 μ M BAP	2,4	45	CHALUPA (1990)
brot. apicais			1,1		
brot. apicais	<i>Acer saccharinum</i>	DKW +10 μ M ZEA	4,4	60	PREECE <i>et al.</i> (1991)
segm. nodais	<i>Ilex paraguariensis</i>	WPM + 8,8 μ M BAP	3,75	30	PAULA (1992)
segm. nodal	<i>Acacia senegal</i>	MS+ 50 μ M ZEA	3,0	60	BADJI <i>et al.</i> (1993)
segmentos nodais	<i>Grevillea robusta</i>	WPM+4,44 μ M BAP + 0,25 μ M ANA	6,1	90	RAJASEKARAN (1994)
brotações apicais	<i>Eucalyptus microcorys</i>	MS + 0,5 e 1,0 μ M BAP	5,0	45	NICCOL <i>et al.</i> (1994)
segm. nodal	<i>Platanus acerifolia</i>	GD + 2,22 μ M BAP	5,2	35	GIULEVA e ATASANOV (1994)
		WPM +4,44 μ M BAP	7,0		
segm. nodal	<i>Fraxinus angustifolia</i>	QL + 8,9 μ M BAP e 0,49 μ M de AIB	5,6	30	PEREZ-PARRON <i>et al.</i> (1994)
segm. nodais	<i>Wrightia tomentosa</i>	MS +8,8 μ M BAP	4	21	PUROHIT <i>et al.</i> (1994)
nó cotiledonar	<i>Wrightia tinctoria</i>	MS +22,12 μ M BAP	7-8	21	PUROHIT e KUKDA (1994)
nó cotiledonar	<i>Sterculia urens</i>	MS + 8,8 μ M BAP	4	20	PUROHIT e DAVE (1996)
segm. nodal	<i>Maytenus ilicifolia</i>	MS +13,3 μ M BAP	3,6	30	PEREIRA <i>et al.</i> (1995)
nó cotiledonar	<i>Stryphnodendron polyphytum</i>	MS+ 13,3 μ M BAP	3,6	30	FRANÇA <i>et al.</i> (1995)
brot. apicais	<i>Cercis canadensis</i>	WPM +44,4 μ M BAP	3,0	30	MACKAY <i>et al.</i> (1995)
epicótilo	<i>Alnus cremastogyne</i>	WPM + 8 μ M BAP	9,7	21	TANG <i>et al.</i> (1996)
nó cotiledonar	<i>Melissa officinalis</i>	WPM + 8,8 μ M BAP	7,0	30	TAVARES <i>et al.</i> (1996)
			17	60	
segm. nodal de plântula	<i>Quercus robur</i>	GD e MS+ 4,44 μ M BAP	3,0	56	PUDDEPHAT <i>et al.</i> (1997)

TM= taxa de multiplicação; DKW= DRIVER e KUNIYUKI, 1984; GD= GRESSHOFF e DOY, 1972; QL= QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977.

3.4.4 Estágio 3: Alongamento, indução e desenvolvimento de raízes

O enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*. Quando a indução de raízes ocorre *in vitro* são utilizados diferentes substratos, tais como: meios de cultura solidificados com ágar e misturas como turfa, vermiculita umedecidas com meio nutritivo ou água e auxinas. Geralmente, o AIB é a auxina mais utilizada, sendo incluída em níveis baixos no meio de cultura ou as brotações são submetidas a tratamentos pulsos, com concentrações elevadas por períodos de tempo reduzido (THORPE *et al.*, 1991).

A rizogênese pode ser dividida em etapas: indução, iniciação e alongamento de raízes, e normalmente, leva de uma a três semanas. As brotações são colocadas em meio basal contendo auxina, por um período determinado, seguido da transferência para outro meio de cultura, desprovido de substância reguladora de crescimento, no qual poderá ocorrer o crescimento e alongamento de raízes. Esse método foi eficiente para algumas espécies lenhosas florestais, tais como: *Eucalyptus* (GUPTA *et al.*, 1993), *Castanea sativa* (CHALUPA, 1987), *Betula celtiberica* (PEREZ e POSTIGO, 1989) e *Ilex paraguariensis* (PAULA, 1992).

Meios de cultura com concentrações reduzidas de sais, como WPM e GD (GRESSHOFF e DOY, 1972), freqüentemente aumentaram as percentagens de enraizamento de brotações axilares de espécies lenhosas (CHALUPA, 1987). Geralmente, quando os meios de cultura foram solidificados com ágar, os nutrientes também foram reduzidos de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ da composição original e a sacarose para 1 e 2% (THORPE *et al.*, 1991). CHALUPA (1987) relatou que para muitas espécies lenhosas, quando a concentração de sais é reduzida a $\frac{1}{2}$ ou a $\frac{1}{3}$ da concentração normal, as percentagens de enraizamento aumentaram. Meios de cultura com baixas concentrações de sais, como o WPM, foram mais eficientes na indução de raízes do que o MS e uma baixa concentração de auxina (0,5-2,5 μ M) estimulou a indução e alongamento de raízes no mesmo meio basal.

Tratamentos pulsos com auxinas foram testados em espécies lenhosas do gênero *Salix*, *Betula* e *Ulmus*, as quais enraizaram *ex vitro* com muita facilidade quando colocadas numa mistura de turfa, perlita ou areia (CHALUPA, 1987). Alguns exemplos são apresentados na tabela 3.

TABELA 3. TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB NA INDUÇÃO DE RAÍZES DE ESPÉCIES LENHOSAS.

Espécie	Material	Tratamento	Enraizamento (%)	AUTORES
<i>Quercus shumardii</i>	juvenil	2,5 mM AIB – 15 min.	73	BENNETT e DAVIES JR. (1986)
<i>Quercus robur</i>	juvenil/	2,5 mM AIB – 10 min.	70,8/58,3	VIEITEZ <i>et al.</i> (1985)
	adulto	5,0 mM AIB – 2 min.	83,3/63,3	
<i>Quercus petraea</i>	juvenil	2,5 mM AIB – 6 min.	58,3-100	SAN-JOSE <i>et al.</i> (1990)
	adulto	5 mM AIB – 2 min.	38	
<i>Acer saccharinum</i>	adulto	1,0 mM AIB – 15 seg.	70	PREECE e HUETTEMAN (1991)
<i>Pinus halepensis</i>	juvenil	1,0 mM AIB – 6 h	90	LAMBARDI <i>et al.</i> (1991)
<i>Wrightia tinctoria</i>	juvenil	2,5 mM AIB – 5 min.	80	PUROHIT e KUKDA (1994)
<i>Wrightia tomentosa</i>	juvenil	0,5 mM AIB – 15 min.	70	PUROHIT <i>et al.</i> (1994).
<i>Grevillea robusta</i>	juvenil	0,54 mM AIB – 20 min.	32	RAJASEKARRAN (1994)
		30 min.	100	
<i>Sterculia urens</i>	juvenil	2,5 mM AIB – 10 min.	60	PUROHIT e DAVE (1996)

3.4.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de mudas

Para evitar a perda de plântulas obtidas *in vitro* no transplântio para a terra, uma fase de aclimatização vem sendo utilizada pela maioria dos pesquisadores, com a transferência gradativa das mudas para a casa de vegetação. Essa fase intermediária visa a adaptação das mudas às novas condições ambientais: umidade relativa mais baixa, maior luminosidade e temperaturas variáveis. Para algumas plantas, esse estágio é um sério obstáculo para o uso de cultura de tecido em propagação massal. Após a transferência, as plântulas murcham rapidamente, tornam-se dessecadas e morrem (SUTTER e LANGHANS, 1979). Uma explicação para esse fenômeno é que as plantas cultivadas assepticamente crescem em condições de umidade relativa alta e sempre sofrem um estresse de água severo quando expostas a umidades relativas inferiores. Esse estresse de água é a principal causa do choque do transplântio, isto é, da morte das plantas cultivadas assepticamente, quando transferidas para a casa de vegetação (BRAINERD e FUCHIGAMI, 1981). Além disso, as plantas obtidas *in vitro* apresentam muitas deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, permitindo uma rápida perda de água. Os estômatos são pouco funcionais e respondem muito lentamente ao estresse hídrico; a camada de cera protetora sobre as folhas é mínima ou inexistente; a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes ainda é precária para permitir um fluxo transpiratório adequado (PREECE e SUTTER, 1991).

As plântulas regeneradas *in vitro* são aclimatizadas em casa-de-vegetação e, posteriormente, em condições de campo. A transição entre o ambiente *in vitro*, com quase 100% de umidade relativa e o ambiente *ex vitro* das condições de campo, com aproximadamente 50% de umidade relativa é crítica para a sobrevivência das plântulas. É necessário reduzir gradativamente a umidade de 100% para as condições de campo. As folhas das plântulas *in vitro* praticamente não apresentam cutícula e não são fotossinteticamente ativas. Assim que as plântulas saem do ambiente *in vitro*, os genes da fotossíntese são ativados imediatamente para as plântulas sobreviverem (PREECE e SUTTER, 1991; AHUJA, 1993).

3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Embriogênese somática, adventícia ou assexual foi definida como a formação de embriões a partir de células simples de tecidos somáticos, sem a presença de conexões vasculares com os tecidos maternos (HACCIUS, 1978). Também pode ser definida como o desenvolvimento de embriões a partir de células simples ou pequenos aglomerados celulares que não são o produto de fusão de gametas e que se desenvolvem por meio de estádios ontogenéticos característicos da embriogênese zigótica (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Embriões somáticos são embriões derivados de células somáticas que são capazes de se desenvolver em plântulas juvenis por uma série de mudanças morfológicas que estão associadas com a seqüência de desenvolvimento dos embriões zigóticos, assumindo os estádios globular, cordiforme e torpedo das plantas dicotiledôneas (DE JONG *et al.*, 1993; KIYOSUE *et al.*, 1993; TOONEN e VRIES, 1996). A embriogênese somática reconstitui os eventos da embriogênese zigótica resultando na produção de embriões bipolares contendo ápices caulinares e radiciais (AHUJA, 1993). Muitos estudos comparativos vêm sendo realizados para entender melhor os mecanismos fisiológicos, genéticos e moleculares que regulam a embriogênese zigótica e somática (ZIMMERMAN, 1993; DE JONG *et al.*, 1993; WEST e HARADA, 1993; KIYOSUE *et al.*, 1993; MISRA, 1994, 1995; DODEMAN *et al.*, 1997).

Todas as células somáticas de uma planta contêm a informação genética necessária para regenerar uma planta completa e funcional. A expressão de genes é regulada permitindo que ocorra a diferenciação de vários órgãos à medida que a planta se desenvolve (MERKLE *et al.*, 1995).

As células vegetais podem se dividir, diferenciar e regenerar um organismo inteiro, mesmo depois que ocorra a diferenciação de células nas plantas maduras. Essa capacidade foi denominada de totipotência e proposta por Haberlandt, em 1902. Uma das mais notáveis demonstrações de totipotencialidade em células de plantas superiores é a obtenção de estruturas embrionárias bipolares *in vitro*. A totipotencialidade das células vegetais cultivadas *in vitro* foi estabelecida inicialmente por REINERT (1958) e STEWARD *et al.* (1958), os quais descreveram a indução de embriões somáticos a partir de calos derivados do ápice da raiz de cenoura (*Daucus carota*). Nos anos seguintes, demonstrou-se que um grande número de espécies e famílias de plantas são capazes de formar embriões somáticos *in vitro* (TISSERAT *et al.*, 1979). A embriogênese somática já foi relatada para 300 espécies de uma grande variedade de plantas, tais como: cereais, gramíneas, leguminosas, frutíferas, ornamentais, medicinais e florestais (BAJAJ, 1995).

3.5.1 Ocorrência natural da embriogênese somática

A embriogênese somática ocorre tanto *in vitro* como também na natureza. Como exemplo, as espécies que produzem sementes com poliembrião, nas quais os embriões adventícios ou somáticos são produzidos por apogamia a partir do nucelo ou do tecido do integumento, como em muitas variedades de *Citrus* e outras árvores tropicais; ou por clivagem a partir do pró-embrião em desenvolvimento, como em coníferas (LITZ e GRAY, 1995). Segundo TISSERAT *et al.* (1979), em geral, o nucelo origina embriões de sementes poliembriônicas, apesar de que outros tecidos, tais como: integumento, sinérgides e suspensor do embrião, ou seja, estruturas intra-ovulares estão associadas com a embriogênese somática *in vivo*. Em cada rudimento seminal (óvulo) é formado mais do que um embrião e não ocorre sincronia no desenvolvimento dos embriões. Assim, um rudimento seminal pode conter embriões em vários estádios de desenvolvimento e nem todos amadurecem (TISSERAT *et al.*, 1979). Na mesma família, gênero ou espécie podem ocorrer sementes monoembriônicas e poliembriônicas. Para algumas espécies a fecundação é necessária para estimular a formação de embriões somáticos; para outras, só a polinização é necessária e, em outras, nem a polinização é necessária.

3.5.2 Padrões da embriogênese somática

Existem dois modelos de desenvolvimento embriogênico *in vitro*: direto e indireto e podem ser caracterizados pelo tempo relativo de determinação e diferenciação em células

embriogenéticas. 1- Embriogênese somática direta: os embriões somáticos originam-se diretamente dos tecidos na ausência de formação de calos. Exemplos: *Citrus*, *Ilex aquifolium*, *Malus domestica*, *Mangifera indica*, *Theobroma cacao*, *Pyrus* sp. (MINOCHA e MINOCHA, 1995), *Euterpe edulis* (GUERRA e HANDRO, 1998), *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO, 1998). 2- Embriogênese somática indireta: a formação de calo é um pré-requisito para o desenvolvimento do embrião somático (SHARP *et al.*, 1980). Exemplos: *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*, *Coffea arabica*, *Corylus avellana*, *Pawlonia tomentosa*, *Vitis vinifera* (MINOCHA e MINOCHA, 1995).

A expressão destes dois padrões embriogênicos diferentes parece estar relacionada com os eventos determinativos da citodiferenciação durante o ciclo mitótico (SHARP *et al.*, 1982). A embriogênese somática direta ocorre a partir de células que já são determinadas para o desenvolvimento embriogênico, antes de serem cultivadas e são denominadas de células determinadas pré-embriogênicas. Elas necessitam apenas de reguladores de crescimento ou condições favoráveis para que ocorra divisão celular e a expressão da embriogênese, ou seja condições indutivas favoráveis para iniciar o desenvolvimento do embrião. Em contraste, a embriogênese somática indireta necessita da redeterminação de células diferenciadas, proliferação de calo e desenvolvimento do estado embriogênico. Para essas células denominadas de determinadas induzidas embriogênicas, os reguladores de crescimento são necessários para reiniciar a mitose e para a redeterminação do estado embriogênico. Essa teoria auxiliou na conclusão de que o estado intrínseco das células do explante é de grande importância para expressão da embriogênese somática e as substâncias de crescimento exógenas são permissivas para expressão desse modelo de desenvolvimento determinado intrinsecamente (SHARP *et al.*, 1980). Segundo CARMAN (1990), as células embriogênicas são extremamente sensíveis a pequenas alterações do ambiente químico e físico, diferindo daquelas das gemas florais, das raízes e das partes aéreas, as quais assumem um estado de determinação. Por apresentarem plasticidade no desenvolvimento é incorreto descrevê-las como determinadas pré-embriogênicas e determinadas induzidas embriogênicas, designando-as apenas como células embriogênicas.

RAEMAKERS *et al.* (1995) constataram que existe uma relação entre a frequência de embriogênese somática direta ou indireta e os reguladores de crescimento utilizados durante a indução dos embriões. A embriogênese somática direta foi observada em aproximadamente 70% das espécies nas quais os meios de cultura foram suplementados com citocininas ou sem reguladores de crescimento e a indireta em 13% das espécies. Os embriões das espécies

testadas, que foram inoculados em meios de cultura contendo auxina ou um balanço auxina/citocinina induziram embriogênese somática indireta.

Os modelos diretos de indução e expressão da embriogênese somática, na maioria dos casos, estão associados a dois aspectos determinativos. O primeiro relaciona-se com o emprego de explantes embrionários e o segundo com o estágio de desenvolvimento desses explantes e, neste caso, tem se observado que a indução e iniciação dos embriões somáticos ocorre a partir das células da epiderme. A embriogênese somática indireta é padrão de resposta associada com o emprego de explantes juvenis e maduros, cujos tecidos apresentam graus variados de diferenciação e cuja seqüência de eventos relaciona-se com processos de desdiferenciação das células do explante, rediferenciação e transformação da fase do ciclo de vida, como por exemplo, as mudanças de uma célula somática ou de um calo em um embrião. Auxinas fortes são os sinais químicos mais empregados para alterar a determinação das células dos explantes, conferindo novas competências (GUERRA *et al.*, 1999).

As culturas embriogênicas de muitas espécies apresentam a capacidade de proliferar indefinidamente e esse processo é denominado de embriogênese repetitiva, recorrente ou secundária (MERKLE *et al.*, 1995). Embriogênese somática repetitiva é um tipo especial de embriogênese indireta que consiste da produção de embriões somáticos utilizando os próprios embriões somáticos como explantes iniciais. Segundo RAEMAKERS *et al.* (1995), esse tipo de embriogênese já foi descrita para pelo menos 80 espécies de Angiospermas e Gimnospermas e está associado com a perda de controle de um grupo integrado de células organizadas existentes nos embriões somáticos.

As auxinas são os principais fitorreguladores utilizados para indução de embriões somáticos da maioria das espécies, sendo consideradas mediadoras da transição de células somáticas para embriogênicas, permitindo a proliferação contínua dessas células (YEUNG, 1995; DODEMAN *et al.*, 1997). Geralmente, a embriogênese somática se realiza em duas etapas: na primeira, ocorre indução de células com competência embriogênica (referidas como massas embriogênicas, pró-embriões), na presença de concentrações elevadas de auxina e na segunda, o desenvolvimento de massas embriogênicas em embriões, na ausência ou na presença de concentração reduzida de auxina (THORPE, 1994). No entanto, a presença contínua de auxina no meio de cultura pode inibir o desenvolvimento normal e maturação dos embriões e se o nível de auxinas for suficientemente alto reinicia-se a produção de embriões somáticos. A concentração de auxinas necessária para a manutenção da embriogênese repetitiva varia entre diferentes espécies (MERKLE *et al.*, 1995). Algumas espécies como

nogueira, necessitaram apenas de um tratamento pulso de auxina para estabelecer ciclos repetitivos de formação de embriões somáticos, sendo esses mantidos indefinidamente em meio basal sem regulador de crescimento. Esse sistema foi denominado de autoembrionia, uma vez que não são necessários reguladores de crescimento exógenos para a manutenção e proliferação do estado embriogênico (MERKLE *et al.*, 1995).

A embriogênese repetitiva tem permitido a manutenção da capacidade embriogênica por mais de dois anos para muitas espécies, tais como: *Citrus sinensis*, *Camellia japonica*, *Eucalyptus citriodora*, *Juglans nigra* e *Picea glauca* (RAEMAKERS *et al.*, 1995).

3.5.3 Caracterização das células embriogenéticas

As células somáticas que originam embriões somáticos são denominadas de células embriogenéticas. DE JONG *et al.* (1993) utilizaram o termo células embriogênicas para descrever aquelas células que completaram a transição de uma célula somática para um estágio onde não são mais necessários estímulos externos para a produção de embriões somáticos.

As células embriogenéticas apresentam características de células meristemáticas em divisão ativa: tamanho pequeno (100-200 μm), parede fina, forma isodiamétrica, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, poucos vacúolos pequenos e presença de grãos de amido conspícuos (TISSERAT *et al.*, 1979; SHARP *et al.*, 1980; WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; GUERRA *et al.*, 1999). Ao contrário, as células não embriogenéticas ou células calosas apresentam tamanho variado, de alongadas a esféricas, altamente vacuolizadas, com uma fina camada periférica de citoplasma e um núcleo próximo da parede celular que se cora fracamente (THORPE, 1988 e 1994). As propriedades histoquímicas e ultraestruturais das células embriogênicas sugerem intensa atividade metabólica e síntese de RNA (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

A expansão celular e a divisão celular assimétrica são mecanismos importantes para a formação de células embriogênicas sendo que ambos estão ligados com a distribuição de componentes citoplasmáticos e com a polaridade celular (DODEMAN *et al.*, 1997). Como foi relatado por YEUNG (1995), existem muito poucas informações dos eventos iniciais que estabelecem a polaridade das células embriogênicas. As células embriogênicas são plásticas no seu desenvolvimento, nos primeiros estágios de formação do pró-embrião, onde a polaridade é fraca e só se torna forte quando ocorre a formação dos cotilédonos no embrião somático.

Segundo TAUTORUS *et al.* (1991), a abundância de organelas é um indicador de crescimento celular. Desse modo, a atividade mitótica é uma propriedade essencial das células embriogênicas. YEUNG (1995) acrescentou que o citoplasma ativo e o acúmulo de proteínas de reserva são características indicativas da embriogênese somática.

A presença de amido em células potencialmente morfogenéticas levou alguns pesquisadores a considerá-lo como um marcador embriogenético ou morfogenético e isso foi constatado para *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988), *Feijoa sellowiana* (CANHOTO e CRUZ, 1996; DAL VESCO, 1998), *Vitis rupestris* (FAURE, 1989), *Quercus suber* (EL MAÂTAOUI *et al.*, 1990), *Camellia reticulata* (PLATA *et al.*, 1991), *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ, 1994) e *Apium graveolenses* (CHOI e SOH, 1997). Isso indica, como foi sugerido por STAMP (1987), que o amido é metabolizado rapidamente em massas celulares embriogênicas, fornecendo energia para a intensa atividade mitótica e metabólica. Outros autores relataram que ocorria acúmulo de amido na organogênese e que o amido é mobilizado e utilizado como uma fonte primária de energia nos primórdios de gemas e raízes em desenvolvimento. Assim, independente de qual rota morfogenética está sendo seguida (organogênese ou embriogênese somática), o metabolismo de amido contribui para satisfazer as necessidades energéticas das células meristemáticas em divisão.

Muito poucos estudos têm utilizado acúmulo de amido para avaliar o desenvolvimento de um embrião somático. Nos estudos realizados, constatou-se um aumento no conteúdo de amido durante a maturação dos embriões somáticos, sendo que esses continham níveis significativamente mais altos do que os dos embriões zigóticos. Esses resultados indicaram que os embriões somáticos são metabolicamente diferentes dos embriões zigóticos e incapazes de converter carboidratos em lipídeos e proteínas de reserva. As condições de maturação, tais como: concentrações de sacarose, reguladores de crescimento exógenos, osmóticos e outros fatores influenciam os níveis de amido dos embriões somáticos (MERKLE *et al.*, 1995).

Estudos de massas pró-embriogenéticas de cenoura indicaram que existem muitas diferenças entre células embriogênicas e não embriogênicas. As células embriogênicas caracterizaram-se por serem pequenas ($400-800\ \mu\text{m}^3$), conectadas em todas as faces por plasmodesmas ($2-4$ por μm^2), apresentavam pequenos vacúolos (30% do volume celular) e muitos grãos de amido ($5-25$ por célula). As células não embriogênicas eram maiores ($1000-3000\ \mu\text{m}^3$), arredondadas, apresentavam espaços intercelulares, poucos plasmodesmas ($0,1-1$

por μm^2), grandes vacúolos (80% do volume celular) e continham poucos grãos de amido (1-2 por célula) (EMONS, 1994).

O armazenamento de lipídeos também pode ser considerado um indicador que o tecido cultivado *in vitro* irá formar embriões somáticos e isso foi observado em embriões somáticos de *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988), *Hevea brasiliensis* (CAILLOUX *et al.*, 1996), *Borago officinalis* (QUINN *et al.*, 1989).

Alguns pesquisadores, ao contrário do que foi relatado para muitas espécies, constataram que o amido e/ou lipídeos acompanha o desenvolvimento não embriogenético (ZAZI e DICKISON, 1990; TELMER *et al.*, 1993 e BARCIELA e VIEITEZ, 1993).

Análises histológicas demonstraram que os embriões somáticos se formam, freqüentemente, a partir de células embriogênicas individualizadas, que, por divisões celulares polarizadas e controladas são similares, se não forem idênticas àquelas observadas durante a embriogênese zigótica (CARMAN, 1990).

Muitos autores tem proposto que o isolamento das células embriogênicas pela deposição de uma parede celular espessa é um pré-requisito para a formação de um embrião somático (CANHOTO e CRUZ, 1996). No entanto, resultados de outros experimentos tem entrado em conflito com essa hipótese. CANHOTO e CRUZ (1996), tentando explicar esses resultados contraditórios, sugeriram que o isolamento só é necessário quando as células embriogênicas são circundadas por tecidos não-embriogênicos.

3.5.4 Controle da embriogênese somática

Existem muitos aspectos da embriogênese somática que ainda não foram totalmente elucidados, tais como: a origem dos embriões somáticos a partir de células simples ou múltiplas, as semelhanças ou diferenças entre embriogênese somática e zigótica e a importância dos reguladores de crescimento exógenos no processo de indução de embriões somáticos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

A iniciação de embriões somáticos pode ocorrer a partir de uma célula isolada ou de um agregado multicelular, muitas vezes referido como uma massa celular pró-embriogenética. Existem relatos da origem dos embriões somáticos a partir de uma célula isolada, como por exemplo para alfafa (SANTOS *et al.*, 1983), *Panicum maximum* (LU e VASIL, 1985) e em alguns sistemas da origem multicelular, como para *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988); *Camelia japonica* (BARCIELA e VIEITEZ, 1993), *Trifolium rapens* (MAHESWARAN e WILLIAMS, 1985), *Camellia reticulata* (PLATA *et al.*, 1981),

Theobroma cacao (ALEMANNO *et al.*, 1996) e, em outros sistemas, os embriões somáticos são formados a partir de células isoladas e agregados multicelulares na mesma cultura (PENCE *et al.*, 1980; SANTOS *et al.*, 1983; MAHESWARAN e WILLIAMS, 1985; QUINN *et al.*, 1989). CANHOTO e CRUZ (1996) afirmaram que a origem da maioria dos embriões somáticos de *Feijoa sellowiana*, provavelmente é multicelular, apesar de também terem sido observados embriões somáticos derivados de células epidérmicas isoladas.

Segundo TOONEN e VRIES (1996), as evidências de que os embriões somáticos são originados a partir de uma célula isolada se baseiam na observação de que a célula se divide assimetricamente como o zigoto. Por outro lado, alguns autores relataram que a origem unicelular dos embriões somáticos, muitas vezes, é difícil de ser comprovada, sendo que seria mais correto considerar que os embriões somáticos são um resultado do comportamento coordenado de um grupo de células que se encontram no mesmo estado de indução e, sob determinadas circunstâncias, se diferenciam em um embrião somático (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; CANHOTO e CRUZ, 1996). FAURE *et al.* (1996) também acrescentaram que é muito difícil, se não for impossível, estudar os planos de segmentação e estabelecer a origem e a relação entre as células que constituem os pró-embriões somáticos.

Os fatores que determinam a origem unicelular ou multicelular dos embriões somáticos ainda não foram elucidados. Segundo MERKLE *et al.* (1995), existe uma hipótese que as células determinadas pré-embriogênicas formam embriões de origem multicelular, enquanto que os tecidos de células induzidas embriogênicas formam embriões de origem unicelular, apesar de ocorrerem exceções. Uma outra hipótese determina que os embriões somáticos primários teriam origem multicelular e os embriões somáticos secundários teriam origem unicelular.

Existem muitas razões para se desejar que apenas uma célula somática se desenvolva diretamente num embrião somático, quando se utiliza um sistema experimental. Primeiramente, isso permite concluir que as alterações observadas numa célula específica estão diretamente relacionadas com o processo de embriogênese somática. Um outro aspecto é que os embriões somáticos originados de uma célula isolada, geralmente, apresentam uma maior semelhança morfológica com os embriões zigóticos. Finalmente, quando o processo de embriogênese somática é originado a partir de uma célula isolada, simplifica as descrições de eventos celulares e a interpretação de marcadores moleculares da embriogênese (TOONEN e VRIES, 1996). CANHOTO e CRUZ (1996) acrescentaram que a determinação da origem dos embriões somáticos é essencial se o sistema embriogênico for utilizado para transformação

genética de plantas, tendo em vista que somente embriões de origem unicelular podem produzir plantas geneticamente homogêneas.

Os principais fatores que controlam a embriogênese somática são: escolha do explante, escolha de nutrientes e reguladores de crescimento, período de subcultivo, (frequência e seleção) e o genótipo (CARMAN, 1990).

3.5.4.1 Fonte de explantes

Embriões somáticos podem se desenvolver diretamente a partir de um explante com tecidos organizados, de protoplastos isolados, ou indiretamente por intermédio de calos ou suspensões celulares (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

O estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico dos tecidos do explante são os aspectos mais importantes para a iniciação de culturas embriogenéticas. Para isto é fundamental o reconhecimento de tecidos embriogenéticos competentes em estágios iniciais. A importância deste estado fisiológico é reforçada pela observação de que culturas embriogenéticas são rapidamente obtidas a partir de gemas florais, inflorescências, folhas novas, embriões e partes de plântulas e dificilmente a partir de tecidos diferenciados de plantas adultas (GUERRA, 1989; LITZ e GRAY, 1995). O explante mais utilizado para induzir e estudar a embriogênese somática direta é o embrião zigótico imaturo. Esse tecido já é embriogênico por natureza e, aparentemente, requer menos suplementos do que outros tecidos somáticos para induzir uma resposta de embriogênese somática. FINER (1995) acrescentou que a idade do embrião zigótico ou o número de dias depois da polinização devem ser avaliados para determinar o melhor estágio de indução.

O uso de embriões zigóticos como fonte de explantes, geralmente não é uma limitação, com exceção das espécies de polinização cruzada, nas quais o embrião zigótico ou plântula representa um genótipo desconhecido. LITZ e GRAY (1995) ressaltaram que com poucas exceções (sementes poliembriônicas), as plantas que crescem a partir de sementes representam recombinantes meióticos de dois parentais e assim, eles não podem ser geneticamente idênticos.

As células dos explantes podem se tornar embriogênicas por vários procedimentos que incluem: exposição aos reguladores de crescimento, tratamentos choque de pH, de temperatura e com vários químicos. Geralmente, só um número limitado de células num determinado explante respondem se tornando embriogênicas. Essas células são, geralmente, chamadas células competentes para embriogênese. Se essas células competentes irão

expressar as suas características embriogênicas depende do ambiente de cultivo, do balanço hormonal, condição osmótica, sacarose, aminoácidos e concentrações de sais (EMONS, 1994; LITZ e GRAY, 1995).

Para algumas espécies, a escolha do material inicial é de grande importância para obtenção de linhagens celulares com capacidades morfogenéticas. Existem espécies que são capazes de expressar o seu potencial morfogenético, independente do tecido inoculado (cenoura, alfafa, tabaco), enquanto outras, particularmente as monocotiledôneas, somente os tecidos com características embrionárias originam linhagens celulares com capacidades morfogenéticas (BAJAJ, 1995).

3.54.2 Meio de cultura

Geralmente, pelo menos dois meios de cultura diferentes são utilizados para a propagação de plantas via embriogênese somática. Esses meios de cultura diferem pelos tipos e concentrações de reguladores de crescimento e quanto as formulações salinas. Normalmente, o primeiro meio é otimizado para a indução e iniciação da embriogênese somática e o segundo permite o desenvolvimento posterior dos embriões, sendo que as condições que favorecem a primeira fase, geralmente inibem a segunda. A alteração na concentração de sais também tem grande influência na indução e desenvolvimento de embriões somáticos (PREECE, 1995).

Existem muitos meios basais que podem ser usados para a indução da embriogênese somática, no entanto em 70% dos casos bem sucedidos utilizou-se os sais do meio basal MS ou suas modificações. A concentração elevada de sais deste meio de cultura parece ser muito benéfica para o crescimento de embriões somáticos (THORPE, 1988). Outras formulações, como a WPM foram utilizadas para algumas espécies como *Carya illinoensis* (BURNS e WETTZSTEIN, 1997), *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO, 1998) e a formulação LPm tem demonstrado bons resultados na indução da embriogênese somática em coníferas, principalmente para espécies do gênero *Picea* sp (DUNSTAN *et al.*, 1995), *Araucaria angustifolia* (ASTARITA e GUERRA, 1998) e *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO, 1998).

Os embriões somáticos podem se desenvolver como estruturas isoladas nos sistemas de cultura em suspensão, utilizando massas celulares friáveis ou podem ser mantidos num meio solidificado com ágar e suplementado com reguladores de crescimento, sacarose, vitaminas, fonte de nitrogênio inorgânica ou orgânica (EMONS, 1994).

Observações preliminares feitas por HALPERIN e WETHERELL (1965) sugeriram que o nitrogênio reduzido, especialmente o NH_4^+ é essencial para embriogênese somática. Outros pesquisadores constataram que a quantidade de nitrogênio é mais importante do que a sua forma iônica, pois o nitrogênio na forma NO_3^- é tão eficiente quanto o nitrogênio NH_4^+ (TISSERAT *et al.*, 1979). A importância do suprimento de nitrogênio durante a embriogênese somática pode estar relacionada com a sua exigência para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e substâncias de reserva (MERKLE *et al.*, 1991). Segundo GREY *et al.* (1987), uma razão fundamental para a importância do nitrogênio reduzido no metabolismo vegetal, reside no fato de que a amônia é a rota primária pela qual esse elemento é incorporado em compostos orgânicos.

Tem sido demonstrado que a presença de nitrogênio reduzido ou um alto nível de nitrogênio no meio de cultura é necessário para a diferenciação de embriões somáticos de muitas espécies (KAMADA e HARADA, 1979).

Foram realizadas outras investigações com fontes de nitrogênio para substituir o amônio ou nitrato por aminoácidos. Alguns aminoácidos ou amidas intensificam a embriogênese somática *in vitro*. O glutamato e a glutamina (Gln) têm sido parcialmente ou completamente eficiente em substituição ao amônio. Segundo SHARP *et al.* (1980), a glutamina é o aminoácido mais eficiente para promover o desenvolvimento do embrião, quando acrescida de 2,4-D e na ausência de outros compostos nitrogenados. KHLIFI e TREMBLAY (1995) constataram que a Gln pode ser utilizada como única fonte de nitrogênio das células embriogênicas e é o principal componente do meio de cultura de maturação de embriões somáticos de *Picea mariana*.

A adição de nitrogênio orgânico é muito utilizada durante o início da formação da massa celular embriogenética e também pode ser benéfica durante o subcultivo e desenvolvimento organizado dos embriões somáticos (THORPE, 1994). A maturação dos embriões somáticos de *Abies alba* foi intensificada quando aumentou a concentração de caseína hidrolisada (CH) e Gln de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ para $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, indicando com isso que o desenvolvimento dos últimos estágios dos embriões somáticos foi dependente do suprimento externo de nitrogênio orgânico (HRISTOFOROGLU *et al.*, 1995). A CH, possivelmente, por causa da sua composição de aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas, pode intensificar a indução de embriões somáticos (TISSERAT *et al.*, 1979). Segundo HALPERIN (1995), a CH é quase tão eficiente quanto o amônio, como fonte de nitrogênio para promover a indução de células embriogênicas nos explantes. A CH é uma fonte de nitrogênio orgânico comumente

utilizada em concentrações que variaram entre 0,02 a 0,1% e glutamato, asparagina, tirosina e adenina são fontes de nitrogênio reduzido mais freqüentes. Esses aditivos orgânicos podem ter efeitos quantitativos e qualitativos no desenvolvimento organizado dos embriões somáticos (THORPE, 1994).

Os efeitos das fontes de nitrogênio na embriogênese somática podem ser melhor entendidos depois de estudar outros componentes do meio de cultura, especialmente o 2,4-D. Nos experimentos que demonstraram uma exigência por amônio para obtenção de embriões somáticos, as concentrações de 2,4-D utilizadas foram de 2,5 a 25 vezes mais altas do que naqueles sem exigência de amônio. Aparentemente, a exigência pelo amônio está associada com a concentração específica de 2,4-D no meio de cultura (SHARP *et al.*, 1980).

Vários trabalhos têm mostrado os efeitos da concentração e do tipo de carboidrato na embriogênese somática. Infelizmente, nesses estudos não foi determinado se o efeito do carboidrato ocorre na iniciação ou no desenvolvimento dos embriões somáticos (GUERRA *et al.*, 1998). A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais eficiente utilizada na embriogênese somática. As concentrações variam entre 2 e 12%, sendo que as mais utilizadas são as de 2 e 3% para os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (TISSERAT *et al.*, 1979).

As vitaminas adicionadas nos meios de cultura podem intensificar o crescimento e diferenciação de calos, sendo que a tiamina vem sendo utilizada com maior freqüência, seguida pelo ácido nicotínico e piridoxina (THORPE, 1994).

3.5.4.3 Fitorreguladores

Muitos fitorreguladores são utilizados para indução da embriogênese somática em espécies de Dicotiledôneas. RAEMAKERS *et al.* (1995) analisaram quais os reguladores de crescimento mais utilizados nesta etapa inicial da embriogênese somática. Em 26,15% das 65 espécies analisadas, a embriogênese somática primária foi induzida em meios de cultura sem reguladores de crescimento e em 20% das espécies, os meios basais foram suplementados com citocininas e/ou citocininas/auxinas. Das citocininas, BAP foi utilizada com maior freqüência (57%), seguida de Cin (37%), ZEA (3%) e TDZ (3%). Os meios de cultura suplementados com auxinas foram testados em 44,61% das espécies, sendo que o 2,4-D foi utilizado com maior freqüência (49%), seguido pelo ANA (27%), AIA (6%), AIB (6%), picloram (5%) e dicamba (5%). Meios de cultura com combinações de auxinas e citocininas foram utilizados em 47,7% das culturas avaliadas.

A maioria dos sistemas embriogénéticos necessitam de uma concentração elevada de auxina, geralmente, o 2,4-D no meio de cultura de indução de embriões somáticos. As concentrações mais utilizadas variam entre 0,5–27,6 μM (THORPE, 1994), sendo que quando o carvão ativado é incorporado no meio de cultura devem ser usadas concentrações mais elevadas, como por exemplo de 450 μM de 2,4-D (GUERRA *et al.*, 1999).

O papel das citocininas no meio basal primário ou indutor de embriões somáticos está menos evidente, apesar de que geralmente elas são incluídas nos meios de cultura. Segundo relatos feitos por LITZ e JARRET (1993), as citocininas podem ser essenciais para a maturação e germinação de embriões somáticos.

Alguns inibidores de crescimento, tais como o ácido abscísico (ABA) foram testados visando a inibição da embriogénese somática e redução da frequência de anormalidades do desenvolvimento, bem como a formação secundária de embriões a partir de embriões somáticos e a germinação precoce (KRIKORIAN, 1995).

As giberelinas podem estimular a germinação de embriões somáticos, especialmente a emergência de raízes (TISSERAT *et al.*, 1979).

3.5.5 Aspectos morfológicos

Estudos utilizando microscopia óptica e eletrônica possibilitaram melhores descrições das mudanças morfológicas e anatômicas que caracterizaram o desenvolvimento dos embriões somáticos (WEST e HARADA, 1993). Estudos histológicos são úteis tanto para caracterizar a ontogenia dos embriões somáticos, como também para comparações com os embriões zigóticos que podem auxiliar na interpretação de algumas questões relacionadas com o processo de embriogénese somática, tais como: origem dos embriões somáticos, falta de conversão, embriogénese secundária, formação de embriões somáticos anormais, entre outros. Avaliações histológicas têm sido descritas para muitas espécies, como por exemplo: *Theobroma cacao* (PENCE *et al.*, 1980, ALEMANNO *et al.*, 1996, 1997), *Panicum maximum* (LU e VASIL, 1985), *Manihot esculenta* (STAMP, 1987), *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988), *Euterpe edulis* (GUERRA, 1989), *Borago officinalis* (QUINN *et al.*, 1989), *Vitis rupestris* (FAURE, 1989), *Quercus suber* (EL MAÂTAOUI *et al.*, 1990), *Camellia reticulata* (PLATA *et al.*, 1991), *Camellia japonica* (BARCIELA e VIEITEZ, 1993), *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ, 1994), *Vitis vinifera* (FAURE *et al.*, 1996), *Feijoa sellowiana* (CANHOTO E CRUZ, 1996, DAL VESCO, 1998) e *Musa spp* (LEE *et al.*, 1997).

3.5.6 Condições ambientais

O ambiente de cultivo também influencia o processo de embriogênese somática, de modo que pode ocorrer numa variedade de regimes de luz/escuro, apesar de que o escuro, geralmente, é melhor para a indução e iniciação de embriões somáticos (THORPE, 1988). GUPTA *et al.* (1991) relataram que a maioria das culturas embriogênicas são mantidas no escuro, em temperaturas que variam entre 22 e 25° C.

3.5.7 Controle genético

A capacidade de formar embriões somáticos não é simplesmente uma propriedade intrínseca de uma determinada espécie. Trata-se de uma propriedade que está sob controle genético, de modo que, genótipos de uma determinada espécie podem diferir na sua capacidade de indução da embriogênese somática (PARROT *et al.*, 1991). Essas diferenças genotípicas na capacidade embriogênica poderiam refletir as diferenças na capacidade de ativar elementos-chave das rotas embriogênicas. Além disso, genótipos individuais podem ter exigências específicas de capacidade de regeneração (MERKLE *et al.*, 1995).

3.5.8 Estágios da embriogênese somática

O processo de desenvolvimento dos embriões somáticos é realizado seguindo algumas etapas sucessivas: 1- desdiferenciação de células do explante que, muitas vezes, pode ocorrer pela utilização de concentrações altas de auxinas; 2- iniciação do desenvolvimento do embrião, a partir do estágio globular que pode ocorrer com uma drástica redução da concentração de auxina; 3- maturação do embrião com estruturas de armazenamento bem desenvolvidas podem ocorrer com altas concentrações de sacarose; 4- prevenção da germinação, antes da maturação do embrião, utilizando meios com alta osmolaridade e condições especiais de fitorreguladores, incluindo ABA (EMONS, 1994).

3.5.8.1 Iniciação de culturas embriogênicas

As culturas embriogênicas são, geralmente, iniciadas a partir de embriões imaturos e maduros e de explantes de plântulas juvenis inoculados em meios de cultura semi-sólidos, contendo altos níveis de auxinas: 2,4-D ou ácido naftalenoacético (ANA) (20 - 50 μM) e das citocininas: BAP e Cin (10-20 μM) (GUPTA *et al.*, 1993; GUERRA *et al.*, 1999).

A produção de embriões somáticos é determinada pelo número de explantes responsivos e pelo número de embriões produzidos por explante responsivo. RAEMAKERS

et al. (1995) relataram que para muitas espécies, menos do que 50% dos explantes primários produziram embriões somáticos, enquanto mais do que 75% dos embriões somáticos formaram embriões secundários. Para *Medicago sativa*, somente 5 dos 300 embriões zigóticos produziram embriões primários, enquanto que todos os explantes de embriões somáticos formaram embriões secundários (PARROTT e BAILEY, 1993). Para outras espécies também ficou evidente que a produção de embriões somáticos na embriogênese somática primária foi inferior a da secundária.

As culturas embriogênicas caracterizaram-se por apresentarem coloração branca, translúcida e mucilaginosa quando comparadas com os calos que são esverdeados, duros e friáveis (GUPTA *et al.*, 1993). Além dos aspectos morfológicos, massas calosas e pró-embriônicas podem ser distintas por características citoquímicas. Células que reagem fortemente ao corante carmin acético e fracamente ao azul de Evans são embriogênicas e células com reação fraca ao primeiro e intermediária ao segundo são calosas (DURZAN, 1988).

3.5.8.2 Manutenção, multiplicação e cultura massal

Nesta etapa, a estratégia consiste em determinar as condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle restrito dos processos de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embriônicas ou embriões somáticos em estádios globulares iniciais de desenvolvimento. Suspensões celulares são mais adequadas para essa fase, podendo ser cultivadas em biorreatores ou frascos erlenmeyers sob agitação (GUERRA *et al.*, 1999). As células da massa pró-embriônica dividem-se e diferenciam-se continuamente em embriões somáticos secundários, num ciclo repetitivo. As culturas embriogênicas podem ser mantidas por longos períodos em meio líquido contendo 2,4-D ou outra auxina, desde que sejam realizados subcultivos periódicos. Essas culturas em suspensão são constituídas de massas celulares pró-embriônicas (LITZ e GRAY, 1995).

O principal ponto de controle da manutenção de linhagens em ciclos repetitivos diz respeito à uma considerável redução dos níveis de reguladores de crescimento. Nos vários sistemas em funcionamento de coníferas, observou-se que as concentrações médias destes reguladores nesta fase estão na faixa de 2 a 5 μM para auxinas e citocininas (GUPTA *et al.*, 1993). Estas culturas devem ser mantidas no escuro, em salas de cultura com temperatura média de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (GUERRA *et al.*, 1998).

A presença contínua de auxina, quando uma célula embriogenética é obtida pode ser prejudicial para o desenvolvimento normal dos embriões somáticos. Se a concentração de auxina for suficientemente alta, o embrião poderá originar novos embriões somáticos, em vez de prosseguir para o próximo estágio de sua ontogenia. Esse processo foi descrito como embriogênese repetitiva, recorrente ou secundária. Dependendo da espécie e do sistema de cultura utilizado, o ciclo repetitivo pode ser expresso como propagação contínua de vários estágios embrionários, como nas massas pró-embriônicas de cenoura e embriões globulares de *Citrus* e soja. Outros fatores que influenciam a proliferação dos embriões somáticos foram a taxa de amônio/nitrato e um pH baixo (4,0) no meio de cultura. Esses ciclos de embriogênese repetitiva podem ser interrompidos pela remoção ou redução de auxina do meio de cultura, permitindo assim a maturação dos embriões. A embriogênese repetitiva tem a capacidade de perpetuar o estado embriogênico indefinidamente e produzir grandes quantidades de embriões. Isso faz com que a embriogênese somática seja uma poderosa ferramenta capaz de ser explorada para muitos objetivos, tais como: propagação massal e produção de plantas transgênicas (PARROT *et al.*, 1991). Para as espécies com ciclo de vida longo, como por exemplo espécies lenhosas, a preservação de linhagens celulares embriogenéticas pode ser um método eficiente e de baixo custo até que essas linhagens sejam testadas em condições de campo. A embriogênese secundária possibilita a obtenção de elevadas taxas de multiplicação das linhagens celulares (RAEMAEEKERS *et al.*, 1995).

3.5.8.3 Desenvolvimento e maturação

Essa fase consiste em estabelecer condições para estimular a progressão das fases iniciais para as fases tardias, recapitulando a ontogênese do processo zigótico. A estratégia a ser empregada consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer os estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, de tal maneira que ciclos de desenvolvimento e maturação originem um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos a germinarem (GUERRA *et al.* 1999).

A maturação dos embriões somáticos pode ser alterada modificando vários fatores do meio de cultura e ambientais, tais como: nitrogênio reduzido, outros nutrientes inorgânicos, carboidratos, reguladores de crescimento, luz, escuro e método de cultura (AMMIRATO, 1985). A presença de nitrogênio, como nitrato ou amônio, aminoácidos e/ou caseína hidrolisada é uma exigência para a contínua histodiferenciação e maturação do embrião (MERKLE *et al.*, 1995).

Massas celulares proliferando em meios de cultura contendo concentrações relativamente elevadas de 2,4-D só produziram embriões somáticos depois da transferência para meio basal sem a presença de 2,4-D, ou com uma concentração substancialmente reduzida deste regulador de crescimento ou com AIA ou ANA (SHARP *et al.*, 1980). EVANS *et al.* (1981) relataram que durante cultura secundária, em 46% das espécies não foram necessários reguladores de crescimento e 38% necessitavam de AIA ou ANA, combinados com citocininas, em concentrações inferiores às da cultura primária.

Normalmente, os meios de cultura utilizados para maturação dos embriões somáticos são acrescidos de aminoácidos e suplementos orgânicos complexos, sendo que auxina é, muitas vezes, eliminada do meio por causa do seu efeito inibidor na maturação de muitas espécies. O desenvolvimento precoce ou prematuro, particularmente a germinação é o principal problema nesta etapa e isto pode ser controlado aumentando a osmolaridade do meio de maturação com a adição de sacarose ou de ácido abscísico (ABA). No estágio de maturação, os embriões somáticos que crescem *in vitro* são significativamente maiores do que os embriões zigóticos da mesma espécie (LITZ e GRAY, 1995). Segundo GUERRA *et al.* (1999), os meios de cultura de desenvolvimento dos embriões somáticos, muitas vezes, contêm nitrogênio reduzido, na forma de aminoácidos, tais como: glutamina, asparagina e arginina e outros agentes osmóticos, como: polietilenoglicol (PEG), mio-inositol, sorbitol e manitol que podem ser adicionados no meio de cultura em valores de 200 a 350 mM para aumentar a osmolaridade.

Muitas pesquisas utilizaram substâncias de reserva como marcadores para avaliar a qualidade do desenvolvimento do embrião somático, principalmente se concentrando no acúmulo de proteínas e lipídeos (MERKLE *et al.*, 1995).

3.5.8.4 Conversão dos embriões somáticos em plantas

Conversão é o termo utilizado para designar o processo de transformação de embriões somáticos em plantas, crescendo autotróficas no solo. A conversão ocorre com a germinação de embriões selecionados num meio de cultura até que ocorra o aparecimento de folhas verdadeiras, seguida do transplântio das plantas para o solo. Em muitos estudos de embriogênese somática não foram estabelecidos protocolos que resultassem na formação de plantas (SCHULTHEIS *et al.*, 1990). A facilidade com que os embriões somáticos se convertem em plantas difere entre genótipos, espécies e nos próprios sistemas de cultura (PARROT *et al.*, 1991).

A maioria dos meios de cultura de conversão são constituídos de sais com a concentração reduzida pela metade, acrescidos de 1-2% de sacarose, carvão ativado, mio-inositol, vitaminas e um baixo nível de nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos (GUPTA *et al.*, 1991).

A exigência mais importante para que ocorra a conversão é a obtenção de embriões maduros e totalmente desenvolvidos. Os embriões devem apresentar a morfologia externa normal e características internas semelhantes às dos embriões zigóticos. Essas características incluem os compostos de armazenamento, tais como: proteínas, lipídios e carboidratos (GUPTA *et al.*, 1991).

Muito poucos estudos têm sido feitos sobre a deposição de produtos de armazenamento na embriogênese somática. YEUNG (1995) relatou que a quantidade e a composição química dos produtos de armazenamento variam nos embriões somáticos e zigóticos. Nos embriões zigóticos maduros, os corpúsculos proteicos e lipídeos de armazenamento estavam agrupados densamente nas células e distribuídos uniformemente no embrião inteiro, enquanto que nos embriões somáticos maduros só foram encontrados em abundância nos cotilédones.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORGANOGÊNESE

4.1.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes

Em janeiro de 1992, 200 mudas selecionadas de *A. polyneuron* (peroba-rosa), com dois anos de idade, procedentes do viveiro da Universidade Estadual de Londrina - PR foram transplantadas em sacos plásticos de 10 L contendo terra peneirada e colocadas em casa de vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven, pertencente ao Laboratório de Micropropagação Vegetal, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo (DFF), no Setor de Ciências Agrárias (SCA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (FIGURA 16A).

Após um período de adaptação de 15 dias, as mudas foram podadas para estimular a formação de brotações novas e pulverizadas com 0,5 g.L⁻¹ de benomyl (fungicida sistêmico benlate-500) semanalmente. Após três meses, as pulverizações passaram a ser feitas a cada 15 dias (FIGURA 16 B).

Nos meses de inverno (junho e julho), quando as mudas de peroba-rosa não estavam emitindo muitas brotações foram feitas podas drásticas (FIGURAS 16 C e 16 D).

4.1.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas

Brotações apicais de 2 a 4 cm de comprimento, contendo uma ou duas folhas foram coletadas das mudas mantidas na casa de vegetação, desinfestadas e utilizadas como explantes (FIGURAS 16 E).

Uma outra fonte de explantes foi obtida a partir de sementes coletadas no Instituto Florestal de São Paulo, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%, acrescido de 0,1% de tween 20, durante 20 minutos. Após seis lavagens com água deionizada esterilizada, o tegumento das sementes foi retirado e foram inoculadas em meio basal WPM para germinação *in vitro*. As plântulas obtidas após três semanas foram divididas em duas regiões: a região superior ao nó cotiledonar (epicótilo) e a inferior (hipocótilo), cortadas em segmento de 2 cm de comprimento e utilizadas para os experimentos de indução de brotações múltiplas (FIGURAS 13 e 18A).

4.1.2.1 Experimento 1: Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações apicais realizada no verão e no outono de 1992.

As brotações apicais de 2 a 4 cm de comprimento foram coletadas de mudas de peroba-rosa mantidas em casa de vegetação, trazidas para câmara de fluxo laminar e submetidas aos tratamentos assépticos de imersão em soluções de NaOCl (0,125% e 0,25%), durante cinco ou dez minutos. Os tratamentos foram realizados em duas épocas do ano: no final do verão (fevereiro) e no outono (abril) de 1992.

As soluções de NaOCl foram acrescidas de 0,1% de tween 20 e as brotações permaneceram em agitação durante a realização dos tratamentos. Em seguida, foram feitas seis lavagens em água deionizada esterilizada. As brotações foram cortadas em sua extremidade basal e colocadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura.

As avaliações da percentagem de necrose, de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2$ com 5 repetições e 30 brotações por parcela. As médias foram comparadas pela análise de variância com o teste F para contrastes ortogonais. Para as análises estatísticas os dados foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$, conforme recomendação de STEEL e TORRIE (1980).

4.1.2.2 Experimento 2: Efeito do HgCl_2 na desinfestação de brotações apicais realizada no inverno e primavera de 1992.

As brotações apicais coletadas em casa de vegetação foram retiradas das regiões apicais, medianas e basais das mudas e trazidas para câmara de fluxo laminar e submetidas aos tratamentos de imersões com soluções de bicloreto de mercúrio (HgCl_2) (0,025; 0,05 e 0,1%), durante cinco e dez minutos, em duas épocas do ano: inverno e primavera de 1992.

Nas soluções desinfestantes adicionou-se 0,1% de tween 20 e as brotações permaneceram em agitação durante a realização dos tratamentos assépticos. Em seguida, foram feitas seis lavagens sucessivas com água deionizada esterilizada. Com o auxílio de pinças e bisturis, as brotações foram cortadas em sua extremidade basal e colocadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura.

As avaliações da percentagem de necrose, de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial $3 \times 2 \times 2$, com 5 repetições e 30 brotações por parcela. As médias foram comparadas pela análise de

variância com o Teste F para contrastes ortogonais e Teste de Tukey. Para as análises estatísticas, os dados foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

4.1.2.3 Experimento 3: Efeito do HgCl_2 na desinfestação de brotações apicais realizada durante as estações do ano de 1993.

Brotações apicais foram coletadas em casa de vegetação, trazidas para câmara de fluxo laminar e submetidas aos tratamentos assépticos com três concentrações de HgCl_2 (0,025; 0,05 e 0,1%), dois tempos (5 e 10 minutos) e quatro épocas do ano (outono, inverno, primavera e verão). Os tratamentos foram feitos em agitação e acrescentou-se 0,1 % de tween 20 nas soluções desinfestantes. Em seguida foram feitas seis lavagens com água deionizada esterilizada. As brotações foram cortadas em sua extremidade basal e colocadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura.

As avaliações das percentagens de necrose, de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial $3 \times 2 \times 4$, com 4 repetições e 30 brotações por parcela. As médias foram comparadas pela análise de variância, pelo Teste F para contrastes ortogonais e Teste de Tukey. Para as análises estatísticas os dados foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

4.1.2.4 Meio de cultura

O meio de cultura básico utilizado inicialmente foi o de MURASHIGE e SKOOG (1962), referido como meio MS e o MS com a concentração de sais reduzida à metade (MS/2). Os componentes do meio de cultura, com as suas respectivas concentrações são apresentados no anexo 1.

Pelo fato da peroba-rosa ter apresentado sinais de fitotoxicidade ao meio de cultura MS, tais como: necrose e abscisão foliar, um outro meio de cultura de composição mais diluída em macronutrientes passou a ser utilizado, o “woody plant medium”, WPM (LLOYD e MC COWN, 1980) (ANEXO 1). Os meios basais foram suplementados com sacarose (3%), mio-inositol (0,01%), vitaminas do WPM e solidificados com ágar (0,65%). O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura.

4.1.3 Estágio 2: Obtenção de brotações múltiplas

4.1.3.1 Avaliações preliminares

Testes preliminares foram realizados para determinar os fitorreguladores e concentrações mais responsivas na indução de brotações múltiplas. Os explantes utilizados foram brotações apicais de mudas de dois anos de idade, que cresciam em casa de vegetação ou explantes da região do epicótilo ou hipocótilo de sementes germinadas *in vitro*. As substâncias com atividade citocinínica testadas foram: BAP, Cin, ZEA e 2-iP, em concentrações que variaram entre 0,05 e 13,5 μM . Essas substâncias reguladoras também foram combinadas com 0,05 ou 0,5 μM de AIB ou ANA. Os testes foram avaliados durante o cultivo inicial e em dois subcultivos subsequentes.

O TDZ foi testado em brotações apicais de mudas de dois anos de idade nas seguintes concentrações: 0,25; 0,45; 2,25; 4,50 e 9,00 μM , combinadas ou não com 0,5 μM de AIB ou ANA.

Brotações apicais de sementes germinadas *in vitro* foram colocadas em meio de cultura contendo BAP, Cin, ZEA, 2-iP e TDZ, nas seguintes concentrações: 0; 0,2; 2,2; 4,4 e 8,9 μM , durante três subcultivos.

As respostas morfogenéticas obtidas com várias combinações dos fitorreguladores foram avaliadas e experimentos estabelecidos visando otimizar o número de brotações axilares induzidas com capacidade de serem repicadas para meio de cultura de enraizamento.

4.1.3.2 Experimento 1: Efeito da ZEA, BAP e Cin na indução de brotações múltiplas em brotações apicais.

Brotações apicais coletadas na casa de vegetação e estabelecidas *in vitro* foram retiradas do meio de cultura de estabelecimento de culturas assépticas, cortadas em sua extremidade basal e utilizadas como explantes para indução de brotações múltiplas. O meio de cultura utilizado foi o WPM, suplementado com BAP, Cin e ZEA, nas seguintes concentrações: 0; 2,2 ; 4,4 e 8,8 μM . A avaliação foi feita pela contagem do número de brotações por explante, após quatro semanas, durante o cultivo inicial e nos dois subcultivos subsequentes.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 4, com 6 repetições e 10 brotações por parcela. As médias foram comparadas pela análise de

variância e pelo Teste de Tukey. Os efeitos das concentrações dos fitorreguladores foram comparados por análise de regressão.

4.1.3.3 Experimento 2: Efeito de combinações de fitorreguladores na obtenção de brotações múltiplas.

Brotações apicais coletadas na casa de vegetação e estabelecidas *in vitro* foram utilizadas para induzir a formação de brotações mais alongadas. O meio de cultura utilizado foi o WPM, contendo fitorreguladores: 2,25 μM de BAP, ZEA ou Cin, combinados com 1,25 μM de AIB. A avaliação foi feita pela contagem do número de brotações por explante, após quatro semanas, durante o cultivo inicial e nos dois subcultivos subsequentes.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições e 5 plantas por parcela. As médias foram comparadas pela análise de variância e pelo Teste de Tukey.

4.1.3.4 Experimento 3: Efeito de fitorreguladores na indução de brotações múltiplas em explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas *in vitro*.

Segmentos de plântulas germinadas *in vitro* foram coletados da região apical (epicótilo) e abaixo do nó cotiledonar (hipocótilo) e submetidos aos tratamentos de indução de brotações múltiplas. Foram testadas concentrações de BAP (0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM), combinadas ou não com 0,5 μM de AIB ou 0,5 μM de ANA. A avaliação da contagem do número de brotações por explante foi feita durante o cultivo inicial e nos três subcultivos subsequentes em intervalos de quatro semanas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 4, com 6 repetições para a região do epicótilo e 8 repetições para a região do hipocótilo e cada uma com 5 plantas por parcela. As médias foram comparadas pela análise de variância e pelo Teste F para contrastes ortogonais. Os efeitos dos níveis de fitorreguladores foram comparados por análise de regressão.

4.1.4 Estágio 3: Enraizamento

4.1.4.1 Avaliações preliminares

Testes preliminares foram realizados para determinar o efeito do AIB e ANA e as concentrações mais responsivas para indução de raízes. O meio de cultura WPM foi testado com a formulação salina reduzida pela metade (WPM/2) ou a $\frac{1}{4}$ (WPM/4), com 1,5, 2 e 3% de sacarose e suplementado com AIB (2,5, 5, 7,5, 20, 25 e 50 μM) ou ANA (5,5; 11 μM). O

enraizamento também foi testado com dois meios de cultura: no primeiro (meio de indução) foi adicionado auxina e as brotações permaneceram 5, 10, 15 ou 30 dias e depois foram transferidas para o segundo (meio de desenvolvimento das raízes), desprovido de auxina.

Foram realizados testes nos quais as bases das brotações foram submetidas a tratamentos pulsos com 0,62, 1,25, 2,5, 5,0 e 10,0 mM de AIB ou 2,5; 5,0 e 10,0 mM de ANA, durante 5 ou 15 minutos. Em seguida, as brotações foram transferidas para meio basal, isento de fitorregulador, para avaliação do desenvolvimento de raízes.

As brotações regeneradas na etapa de indução de brotações múltiplas foram individualizadas e colocadas em meio de cultura WPM, contendo carvão ativado (0,1%), durante quatro semanas, antes da realização dos experimentos de enraizamento.

4.1.4.2 Experimento 1: Efeito de tratamentos pulsos com soluções de AIB no enraizamento *in vitro* de brotações oriundas de mudas de dois anos de idade

Brotações individualizadas, pertencentes ao 5º subcultivo, medindo aproximadamente 2 cm de comprimento e com a extremidade basal cortada em forma de cunha foram utilizadas como explantes. O enraizamento foi avaliado com tratamentos de imersão da base (0,5 cm) das brotações, em soluções de 0, 2,5, 5,0 e 10,0 mM de AIB, dissolvidas em álcool 20%, durante 5 e 15 minutos. Em seguida, os explantes foram colocados em meio de cultura WPM, com a concentração de sais e sacarose reduzida pela metade, durante quatro semanas. A avaliação das percentagens de enraizamento e a contagem do número de raízes por explante foram feitas após quatro semanas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 2, com três repetições com 5 frascos contendo 4 plantas por repetição. As médias foram comparadas pela análise de variância e pelo Teste de Tukey. O efeito dos níveis de AIB no enraizamento foram comparados por análise de regressão.

4.1.4.3 Experimento 2: Efeito de tratamentos pulsos com soluções de AIB (pH 5,6) no enraizamento *in vitro*

Brotações do 6º e 7º subcultivo de multiplicação e que mediam aproximadamente 2cm de comprimento foram utilizadas como explantes. As brotações foram submetidas a tratamentos com soluções de AIB (2,5; 5,0 e 10,0 mM), dissolvidas em álcool 20% e o pH foi ajustado em 5,6 com NaOH 1N. As bases das brotações foram imersas nas soluções com AIB durante 5 e 15 minutos. Em seguida, as brotações foram colocadas em meio de cultura WPM.

A avaliação da percentagem de enraizamento foi feita diariamente até seis semanas após a instalação do experimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x 2, com quatro repetições, constituídas de três frascos, com cinco brotações por frasco, totalizando 15 brotações por parcela. As médias das percentagens de enraizamento foram comparadas pela análise de variância e pelo Teste de Tukey.

4.1.4.4 Experimento 3: Efeito dos tratamentos pulsos com soluções de AIB no enraizamento *in vitro* de brotações originadas do epicótilo e hipocótilo.

Foram utilizadas brotações entre 1 e 2 cm de comprimento, oriundas de plântulas germinadas *in vitro*, que foram divididas em segmento da região do epicótilo e outro da região abaixo do nó cotiledonar (hipocótilo) e que permaneceram em meio de cultura de indução de brotações múltiplas durante três subcultivos e depois foram colocadas em meio basal WPM, sem fitorreguladores, contendo 0,1 % de carvão ativado, durante seis semanas.

Os tratamentos testados foram os seguintes: imersão da base das brotações (0,5cm) em soluções de 0, 2,5; 5 e 10 mM de AIB, durante 5 e 15 minutos. O AIB utilizado nos tratamentos foi dissolvido em álcool 20% e filtro esterilizado. As brotações foram colocadas em meio de cultura WPM e permaneceram no escuro durante oito dias.

A avaliação da percentagem de enraizamento e do número de raízes por explante foi feita diariamente até seis semanas após a instalação do experimento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 2. Cada parcela foi constituída por cinco frascos contendo quatro plantas por frasco e quatro repetições. As médias de percentagem de enraizamento foram comparadas pela análise de variância e pelo Teste de Tukey e o efeito das concentrações de AIB foi avaliado por análise de regressão.

4.1.4.5 Efeito das condições de luminosidade no enraizamento *in vitro*.

Brotações do 6º subcultivo, originadas da região do epicótilo e do hipocótilo e medindo entre 1 e 2 cm de comprimento foram utilizadas neste experimento de enraizamento. As bases das brotações foram tratadas com solução de 10 mM de AIB, dissolvida em álcool 50% durante 15 minutos. As brotações foram colocadas em meio de cultura WPM, com a concentração de sais reduzidas pela metade (WPM/2) e sacarose 2 %. Os frascos com as culturas foram submetidos a três tratamentos: ausência de luz durante sete dias, base do frasco

culturas foram submetidos a três tratamentos: ausência de luz durante sete dias, base do frasco isenta de luz durante sete dias e presença de luz ($25 \mu E. s^{-1}. m^2$ com fotoperíodo de 16 horas).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições para região do epicótilo, constituídas de quatro frascos, com quatro brotações por frasco e totalizando 16 brotações por parcela e quatro repetições para a região do hipocótilo, com três frascos com cinco brotações, totalizando 15 brotações. As médias da percentagem de enraizamento e do número médio de raízes foram comparadas pela análise de variância.

4.1.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização das mudas

As plântulas obtidas *in vitro* foram plantadas em bandejas de semeadura contendo terra peneirada e “plantmax” na proporção de 3:1. As mudas foram mantidas em casa de vegetação climatizada modelo Van der Hoeven, com sistema de irrigação por nebulização e controle de temperatura (ventilação e aquecimento).

A avaliação foi feita através da taxa de sobrevivência das mudas após um mês de permanência na casa de vegetação. Após três meses de adaptação e crescimento, as mudas de peroba-rosa foram transplantadas para sacos plásticos contendo o mesmo substrato.

4.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

4.2.1 Coleta de frutos e obtenção de sementes

Em agosto de 1995, foram coletados frutos maduros de uma árvore pertencente a Sede do Instituto Florestal de São Paulo, no início da Serra da Cantareira. Embriões maduros foram retirados das sementes e utilizados em testes preliminares de indução de embriões somáticos. No ano seguinte, a peroba-rosa apresentou frutificação abundante e foram realizadas cinco coletas de frutos em vários estádios de maturação, entre os meses de maio a agosto. Essas coletas também foram realizadas na Sede do Instituto Florestal de São Paulo. Os frutos da primeira coleta (maio) apresentaram coloração esverdeada e mediam entre 3,0 a 4,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,4 cm de largura e as sementes de 0,7 a 1,3 cm de comprimento e 0,5 a 0,8 cm de largura (FIGURAS 15B e 15C). Os frutos da última coleta (agosto) apresentaram coloração verde escura para castanho e mediam entre 3,5 a 5,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,7cm de largura.

4.2.2 Desinfestação das sementes

Após as coletas dos frutos, as sementes foram retiradas e armazenadas em sacos de papel à temperatura de 5°C. As sementes foram desinfestadas em soluções de hipoclorito de sódio a 1; 1,5 e 2 %, acrescidas de 0,1% de tween 20, por um período de 20 a 30 minutos. Em seguida foram feitas seis lavagens com água deionizada esterilizada. Com auxílio de pinças e bisturis, os embriões foram retirados e inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo meio basal WPM. Os embriões de sementes poliembriônicas de peroba-rosa foram individualizados e identificados para verificar se o tamanho influenciava as respostas embriogenéticas. As sementes apresentavam variações do número de embriões (2-6), sendo formadas por um embrião maior, ocupando toda a extensão da semente e outros menores, de formas irregulares, dispostos lateralmente e próximos ao eixo hipocótilo-radícula (FIGURA 15 E).

4.2.3 Indução e iniciação de culturas embriogenéticas

4.2.3.1 Fonte de explantes

Embriões maduros, imaturos, folhas novas de mudas de dois anos de idade, coletadas em casa de vegetação e partes de plântulas germinadas *in vitro* foram testados como explantes na etapa de indução de culturas embriogenéticas.

Embriões maduros, imaturos, coletados em agosto de 1995 e a partir de maio de 1996, respectivamente, foram individualizados das sementes poliembriônicas de peroba-rosa e inoculados em tubos de ensaio (25x 150 mm), contendo meio de cultura WPM e combinações de fitorreguladores (4.2.3.3).

Sementes maduras foram colocadas para germinar *in vitro* e após três semanas foram feitas secções de 1 cm de comprimento e foram testadas as seguintes fontes de explantes: extremidades de raízes, cotilédones, hipocótilos e discos foliares. Os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de 2,4-D (2,5; 5,0 ou 10µM) e 0,5 µM de BAP ou TDZ.

4.2.3.2 Meio de cultura

Para os embriões maduros e imaturos foram testadas três formulações de meio de cultura: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD e MC COWN, 1980) e LPm (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981) (ANEXO 1). As formulações salinas do meio de cultura MS e WPM foram suplementadas com caseína hidrolisada (CH) 0,05% e glutamina

(Gln) 0,05%. Os meios de cultura tinham consistência semi-sólida (0,45 % de ágar) e foram suplementados com sacarose (3%), mio-inositol (0,01%) e vitaminas (ANEXO 1).

4.2.3.3 Fitorreguladores

Embriões maduros, coletados em agosto de 1995, foram inoculados em meio de cultura contendo 2,4-D (0; 0,45; 4,50; 11,30; 22,60 μM), combinado ou não com Cin ou BAP (0; 0,45; 2,25; 4,50 μM). O meio de cultura LPm também foi suplementado com 2,4-D (4,50; 11,30 μM) e TDZ (0,045 e 0,45 μM).

No ano seguinte, embriões em vários estádios de maturação, coletados de maio a agosto de 1996, foram retirados das sementes poliembriônicas de peroba-rosa e inoculados em meio de cultura LPm, suplementados com 2,5; 5 e 10 μM de 2,4-D, combinados com 0,5 μM de Cin, BAP ou TDZ. Também foram testadas outras duas combinações de fitorreguladores: 5 μM de 2,4-D + 0,5 μM de Cin + 0,5 μM de BAP e 10 μM de 2,4-D + 0,5 μM de Cin + 0,5 μM de BAP. Embriões imaturos também foram inoculados em meios de cultura WPM e MS, suplementados com 2,4-D: 5 e 10 μM e essas concentrações combinadas com 0,5 μM de BAP, Cin ou TDZ.

Embriões maduros e imaturos também foram inoculados nas três formulações salinas, suplementadas com 2,4-D (2,5, 5 e 10 μM) e concentrações mais elevadas de BAP, Cin ou TDZ (2,5 e 5 μM).

Embriões maduros e imaturos foram inoculados em meio de cultura LPm, suplementado com 0,1% de carvão ativado e concentrações mais elevadas dos fitorreguladores: 2,4-D (226,25 e 452,50 μM), combinados com Cin, BAP ou TDZ (25 μM).

As culturas foram avaliadas a cada quatro semanas, observando-se os seguintes critérios: nenhuma resposta, crescimento do embrião, formação de calo compacto, de várias colorações (branco, amarelo, marrom), formação de massas celulares embriogenéticas e iniciação de embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme e torpedo). Para cada tratamento testado foram inoculados 30 embriões individualizados em tubos de ensaio. As culturas foram mantidas em meio de cultura primário, na ausência de luz, por tempo indeterminado, para verificar o tempo necessário para expressão da embriogênese somática, ou seja, da iniciação de embriões somáticos globulares.

4.2.4 Indução, multiplicação e manutenção de linhagens celulares embriogenéticas

Massas celulares embriogenéticas foram induzidas a partir de embriões maduros e imaturos e isoladas dos meios de cultura LPm, acrescido de 4,5 μM de 2,4-D e 0,45 μM de TDZ ou 4,5 μM de 2,4-D e 0,45 μM de Cin. Essas massas celulares selecionadas foram subcultivadas por repicagens sucessivas para estabelecer e manter ciclos repetitivos de divisão celular e promover o estabelecimento das linhagens celulares. As culturas eram friáveis, de coloração branca translúcida e textura granulosa (FIGURA 22A).

As massas celulares pró-embriogenéticas foram colocadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura LPm, semi-sólido (0,45% de ágar), suplementado com 3% de sacarose, Gln (0,05%), CH (0,05%) e combinações de fitorreguladores: 2,4-D (0,5; 1,25 e 2,5 μM) e Cin (0,5 μM) ou ANA (0,5; 1,5 e 3,0 μM) e Cin (0,5 μM). As massas celulares também foram colocadas em meios de cultura sem fitorreguladores e/ou com carvão ativado (0,1%). As culturas foram mantidas no escuro e com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.5 Maturação dos embriões somáticos e das linhagens celulares embriogenéticas

Pró-embriões e embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme e torpedo) foram subcultivados para meio de cultura de maturação. O meio basal LPm, sólido (0,65% de ágar) foi suplementado com sacarose 3%, Gln (0,05%), CH (0,05%) e várias combinações de fitorreguladores: 2-iP (12,30; 24,60 μM) e ANA (0; 0,25; 0,5 μM) ou os mesmos níveis de 2-iP e AIB (0; 0,25; 0,5 μM); BAP (1,0; 2,22; 4,44 μM) e ANA (0; 0,5 μM); Cin (11,60; 23,23 μM) e ANA (0,5 μM). O meio basal LPm também foi testado isento de fitorreguladores e acrescido ou não de carvão ativado (0,1%). As culturas foram mantidas na luz, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A maturação das linhagens celulares embriogenéticas também foi testada em meio de cultura LPm, sólido (0,65% de ágar), contendo polietileno glicol 8000 (5 e 10 mM) ou ABA (30, 60 ou 120 μM). O ABA foi esterilizado por filtração e adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem. As culturas foram mantidas no escuro.

4.2.6 Conversão de embriões somáticos em plantas

Embriões somáticos no estágio torpedo foram isolados e inoculados em meio de cultura LPm, sólido (0,65% de ágar), com sacarose (3%), mio-inositol (0,01%), CH (0,05%), Gln (0,05%), acrescido ou não de carvão ativado (0,1%), e suplementado ou não com

fitorreguladores: AIB (0,5 μ M); ANA (0,5 μ M) ou BAP (1 μ M) e GA₃ (0,5 μ M). Os embriões somáticos foram mantidos na presença de luz.

4.2.7 Avaliações histológicas

Massas celulares embriogénicas foram selecionadas para secções histológicas visando caracterizar a massa celular friável e embriões somáticos em vários estádios ontogénicos. As massas celulares selecionadas estavam sendo cultivadas em meio de cultura de maturação e apresentavam em sua superfície embriões somáticos nos estágios: globular, cordiforme e torpedo.

Amostras foram fixadas em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 durante 24 horas (KARNOVSKY, 1965). A desidratação foi feita em série alcoólico-etílico (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70%) durante 10 minutos e posteriormente 70%, 96% e 100%, durante duas horas em cada concentração à temperatura ambiente e à vácuo. A parainfiltração foi feita com etanol 100% e resina líquida na proporção de 1:1, mantida à temperatura ambiente, durante 24 horas. A infiltração foi feita com historesina = glicol metacrilato, conforme recomendações do kit JB4 (Polysciences/USA). Secções seriadas de 5-6 μ m de espessura foram feitas em micrótomoto rotativo. As lâminas foram coradas com azul de toluidina - solução aquosa 0,1% durante dois minutos. Após a secagem, as lâminas foram montadas com entellan.

Numa segunda série de amostras, repetiu-se o mesmo procedimento de fixação e infiltração com historesina. Secções seriadas de 3-4 μ m de espessura foram feitas em micrótomoto rotativo. As lâminas foram coradas durante 30 minutos conforme SAKAI (1973) : (7,52 g de Na₂ HPO₄, 9,6 g de ácido cítrico, 0,5 g de azul de toluidina, 1000 ml de água destilada). Após a secagem, as lâminas foram montadas com permouth.

Os registros das fotomicrografias foram feitos em microscópio óptico Zeiss MC80.

4.2.8 Avaliações citoquímicas

As massas celulares pró-embriogénicas selecionadas para as avaliações citoquímicas foram retiradas de meio de cultura de multiplicação e manutenção de linhagens celulares (LPm, suplementado com 1,25 μ M de 2,4-D e 0,5 μ M de Cin) (FIGURA 29A) ou do meio de cultura de maturação, contendo embriões somáticos globulares na sua superfície (LPm, acrescido de 30 μ M de ABA) (FIGURA 29B). Para evidenciar e caracterizar células embriogénicas utilizou-se a dupla coloração com azul de Evans (0,1%) e carmin acético

(2%) (DURZAN, 1988). A presença de grãos de amido e corpúsculos lipídicos foi detectada com a coloração de lugol e sudam III, respectivamente (JOHANSEN, 1940).

Os registros fotográficos das culturas embriogenéticas foram feitos em microscópio estereoscópico SZH 10, com câmara Olympus PM-20 e as fotomicrografias das análises citoquímicas foram feitas com câmara Olympus PM-20 acoplada ao microscópio óptico BX-40 (B-max).

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Todas as etapas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Micropropagação Vegetal, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo (DFF), no Setor de Ciências Agrárias (SCA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba-PR.

Na etapa de estabelecimento de culturas assépticas, as brotações apicais e sementes foram colocadas em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 8 ml de meio de cultura. Nas etapas de obtenção de brotações múltiplas e enraizamento foram utilizados frascos do tipo pote (88 mm de comprimento x 60 mm de largura) contendo 40 ml de meio de cultura. Na etapa de obtenção de brotações múltiplas também foram utilizados frascos individualizados (75 mm de comprimento x 35 mm de largura ou 84 mm de comprimento por 30 mm de largura) contendo respectivamente 15 e 10 ml de meio de cultura.

Para todas as etapas da embriogênese somática, os embriões foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura. Nas etapas de iniciação de culturas embriogenéticas e manutenção de linhagens celulares, as culturas foram mantidas em salas de crescimento na ausência de luz.

Nas etapas de estabelecimento de culturas assépticas, obtenção de brotações múltiplas, enraizamento, maturação e conversão de embriões somáticos, as culturas foram mantidas em salas de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, intensidade luminosa de $25 \mu \text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As plantas matrizes utilizadas para a retirada de explantes e as mudas de peroba-rosa regeneradas *in vitro* foram mantidas em casa de vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven, pertencente ao Laboratório de Micropropagação Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ORGANOGÊNESE

5.1.1 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas

5.1.1.1 Avaliações preliminares

O tratamento sem desinfestante (testemunha) não foi realizado porque testes preliminares apresentaram 100% de contaminação fúngica e bacteriana, indicando com isso, a necessidade da desinfestação das brotações.

Concentrações mais elevadas de hipoclorito de sódio (0,5-1,0%) durante períodos mais prolongados (15 e 20 minutos) foram testadas previamente e não foram utilizadas porque aumentaram muito a percentagem de necrose (40%).

Nessa fase foram realizados três experimentos visando a obtenção de culturas assépticas. Inicialmente foi testado o efeito do NaOCl e durante dois anos consecutivos foi avaliada a desinfestação de brotações apicais com HgCl₂.

5.1.1.2 Experimento 1: Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações apicais realizada no verão e outono de 1992.

A análise de variância da percentagem de necrose dos tratamentos de desinfestação de brotações de peroba-rosa com NaOCl (0,125; 0,25%), durante 5 e 10 minutos, realizados no verão e outono de 1992 demonstraram que somente a interação concentração x tempo foi significativa pelo Teste F ($P \leq 0,05$) (ANEXO 2). A percentagem de necrose das brotações desinfestadas com 0,25% de NaOCl durante 5 minutos foi superior à obtida com a concentração de 0,125% e também em relação ao tempo de 10 minutos (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 4).

TABELA 4. INTENSIDADE DE NECROSE (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM NaOCl.

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,125	8,15 b A ¹	14,85 a A
0,25	17,19 a A	9,42 a B

¹Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas ou maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

Em relação à percentagem de contaminação fúngica das brotações apicais, os tratamentos testados nas duas épocas do ano não apresentaram diferenças pelo Teste F para contrastes ortogonais ($P \geq 0,05$) (ANEXO 2, FIGURA 1). As percentagens de contaminação fúngica variaram entre 11,27 e 24,40%. No entanto, concentração e época foram significativos para percentagem de contaminação bacteriana (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 2). O efeito do tratamento com 0,25% de NaOCl foi de reduzir a contaminação bacteriana das brotações, quando comparado com 0,125% de NaOCl (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). Em relação à época do ano, no outono ocorreu uma redução na percentagem de contaminação bacteriana (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 5).

TABELA 5. CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM NaOCl.

Concentração (%)	
0,125	8,22 a ¹
0,25	2,27 b
Época	
Verão	7,75 a ¹
Outono	2,55 b

¹Médias com letras diferentes diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

A análise de variância da percentagem de sobrevivência das brotações apicais desinfestadas com NaOCl apresentou significância estatística para a interação concentração x tempo (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 2). Tanto no verão, como no outono, o tratamento de imersão em solução de 0,25% de NaOCl, durante 10 minutos apresentou a mais alta percentagem de sobrevivência (71,53%), sendo significativamente superior à de 0,125% e ao tempo de 5 minutos (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 6).

Uma análise conjunta das variáveis avaliadas nos permitiu concluir que o tratamento de imersão em NaOCl a 0,25%, durante 10 minutos pode ser recomendado para a desinfestação de brotações de peroba-rosa, tanto no verão, como no outono, tendo em vista que esse tratamento proporcionou a mais baixa percentagem de contaminação fúngica e bacteriana e a mais elevada percentagem de sobrevivência (FIGURA 1).

TABELA 6. SOBREVIVÊNCIA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM NaOCl.

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,125	61,46 a A ¹	56,88 b A
0,25	56,99 a B	71,53 a A

¹Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas ou maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

5.1.1.2 Experimento 2: Efeito do HgCl₂ na desinfestação de brotações apicais realizada no inverno e primavera de 1992.

A análise de variância da percentagem de necrose dos tratamentos de desinfestação com HgCl₂, realizados no inverno e na primavera de 1992, indicou que apenas a interação concentração x tempo foi significativa (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 3).

As avaliações da percentagem de necrose das brotações apicais dos tratamentos com HgCl₂, testados durante 5 minutos apresentaram diferenças significativas, sendo que a concentração de 0,05% foi a que apresentou a menor percentagem de necrose, quando comparada com às demais concentrações (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). No entanto, as percentagens de necrose das concentrações testadas durante 10 minutos, no inverno e na primavera não apresentaram diferenças significativas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \geq 0,05$). Os dados apresentados na tabela 7 indicaram que o tratamento de desinfestação com 0,05% de HgCl₂, durante 5 minutos reduziu a percentagem de necrose das brotações, quando comparado com o tempo de 10 minutos, para as duas épocas do ano (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$).

TABELA 7. INTENSIDADE DE NECROSE (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl₂.

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,025	9,65 a ¹	8,24 a
0,05	2,69 b	12,38 a
0,1	11,64 a	7,16 a

¹Médias com letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

As avaliações das percentagens de contaminação fúngica dos tratamentos com HgCl_2 apresentaram diferenças significativas para os fatores concentração, época e para interação tempo x época (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 3). A percentagem de contaminação fúngica obtida com a concentração de 0,05% foi inferior às das demais concentrações (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). Os tratamentos realizados na primavera, durante 5 minutos apresentaram percentagens de contaminação fúngica significativamente superiores ao do tempo de 10 minutos e às dos tratamentos realizados no inverno (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 8).

TABELA 8. CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl_2 .

Concentração (%)		
0,025	6,90	
0,05	2,62	
0,1	4,64	
Tempo (min.)	Época	
	Inverno	Primavera
5	3,19 a B ¹	9,03 a A
10	3,50 a A	3,49 b A

¹Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas e maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Para a variável contaminação bacteriana, o fator concentração e a interação concentração x tempo foram significativos pelo Teste F ($P \leq 0,05$) (ANEXO 3).

As concentrações de HgCl_2 testadas durante 5 minutos apresentaram diferenças na contaminação bacteriana das brotações apicais, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 0,05% (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). Entretanto, as concentrações de HgCl_2 testadas durante 10 minutos não apresentaram diferenças significativas para a percentagem de contaminação bacteriana nas duas épocas do ano testadas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \geq 0,05$). A percentagem de contaminação bacteriana das brotações obtidas no tratamento com HgCl_2 (0,1%) durante 10 minutos foi significativamente superior à do tempo de 5 minutos (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 9).

TABELA 9. CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl₂.

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,025	3,80 a ¹	1,69 a
0,05	0,67 a	1,47 a
0,1	1,90 b	5,66 a

¹Médias com letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

A percentagem de sobrevivência de brotações apicais de peroba-rosa desinfestadas com HgCl₂, apresentou significância estatística para concentração e interação concentração x tempo (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 3).

O tempo de desinfestação de 5 minutos testado com as concentrações de HgCl₂ influenciou a percentagem de sobrevivência das brotações, tanto na primavera, como no inverno, sendo que a percentagem de sobrevivência do tratamento com HgCl₂ (0,05%) foi superior à das demais concentrações (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). No entanto, os tratamentos realizados durante 10 minutos não apresentaram diferenças das percentagens de sobrevivência das brotações avaliadas nas duas épocas do ano (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). A percentagem de sobrevivência das brotações obtida no tratamento com HgCl₂ (0,05%), durante 5 minutos foi superior à do tempo de 10 minutos (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 10). Os dados apresentados na figura 2 indicaram que a concentração de 0,05% de HgCl₂, durante 5 minutos foi a mais eficiente para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, tanto no inverno como na primavera do ano de 1992.

TABELA 10. SOBREVIVÊNCIA (%) DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl₂.

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,025	73,80 a ¹	80,76 a
0,05	90,61 a	81,43 b
0,1	76,74 a	82,20 a

¹Médias com letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

5.1.1.3 Experimento 3: Efeito do HgCl_2 na desinfestação de brotações apicais realizada durante as estações do ano de 1993.

A avaliação da percentagem de necrose dos tratamentos de desinfestação com HgCl_2 em brotações de peroba-rosa, realizados durante o ano de 1993 apresentaram diferenças significativas para os fatores tempo, época e para interação tempo x época (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 4).

Em relação à época do ano constatou-se que as maiores percentagens de necrose das brotações foram obtidas no inverno e outono. Dos tratamentos realizados durante 5 minutos, a mais baixa percentagem de necrose foi obtida na primavera, diferindo significativamente da do inverno (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Para o tempo de 10 minutos, as percentagens de necrose obtidas na primavera e verão foram significativamente inferiores às do outono e inverno (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Dos tratamentos realizados no outono, as percentagens de necrose obtidas durante o tempo de 10 minutos foram significativamente superiores às do tempo de 5 minutos (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 11).

TABELA 11. INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA INTENSIDADE DE NECROSE (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl_2 .

Época do ano	Tempo (min.)	
	5	10
Verão	9,31 a b A ¹	7,49 b A
Outono	10,23 a b B	20,00 a A
Inverno	16,10 a A	19,51 a A
Primavera	7,29 b A	9,17 b A

¹Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As avaliações da percentagem de contaminação fúngica das brotações de peroba-rosa obtidas após os tratamentos de desinfestação com HgCl_2 , durante o ano de 1993 foram estatisticamente significativas para os fatores concentração, época do ano e para as interações concentração x época (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 4).

Em relação a época do ano, a percentagem de contaminação fúngica das brotações desinfestadas com 0,025% de HgCl_2 , no verão foi significativamente inferior à do outono e

inverno (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Os tratamentos com 0,1 % de HgCl_2 realizados no outono apresentaram percentagens de contaminação fúngica superiores às obtidas nas outras épocas do ano (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 12).

TABELA 12. INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl_2 .

Época do ano	Concentração (%)		
	0,025	0,05	0,1
Verão	7,64 c ¹	6,22 a	5,88 b
Outono	20,66 a	8,43 a	15,75 a
Inverno	18,46 a b	1,98 a	4,69 b
Primavera	8,75 b c	3,72 a	1,79 b

¹Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A análise de variância da percentagem de contaminação bacteriana das brotações apicais de peroba-rosa desinfestadas com HgCl_2 durante o ano de 1993 foi significativa para os fatores concentração, tempo e época e para interação concentração x tempo (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 4). Em relação à época do ano, as brotações submetidas as concentrações de HgCl_2 testadas no outono apresentaram as menores percentagens de contaminação bacteriana, diferindo significativamente das obtidas no verão (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 13).

Das concentrações de HgCl_2 testadas, as percentagens de contaminação bacteriana das brotações apresentaram diferenças nos tratamentos realizados durante 5 minutos, sendo que a concentração de 0,05% foi a que apresentou a mais baixa percentagem (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). No entanto, as percentagens de contaminação bacteriana das brotações nos tratamentos testados durante 10 minutos, em todas as épocas do ano, não apresentaram diferenças significativas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \geq 0,05$). Em relação ao tempo de tratamento, os dados apresentados na tabela 13 revelaram que a percentagem de contaminação bacteriana das brotações obtida com o tratamento de 0,025% de HgCl_2 durante 10 minutos foi inferior à do tempo de 5 minutos (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$).

TABELA 13. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE TRATAMENTO E ÉPOCA DO ANO NA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl_2 .

Concentração (%)	Tempo (min.)	
	5	10
0,025%	7,51 a ¹	2,16 b
0,05%	1,79 a	2,10 a
0,1%	4,08 a	3,23 a
Época do ano		
Verão	5,01 a ²	
Outono	1,31 b	
Inverno	3,89 a b	
Primavera	3,43 a b	

¹ Médias com letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

² Médias com letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A análise de variância da percentagem de sobrevivência de brotações apicais de peroba-rosa desinfestadas com HgCl_2 no ano de 1993 foi significativa para os fatores concentração, época e para interação concentração x época (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 4).

As brotações de peroba-rosa submetidas aos tratamentos de desinfestação com 0,025% de HgCl_2 , realizados na primavera e no verão apresentaram as mais altas percentagens de sobrevivência (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). A percentagem de sobrevivência obtida pelo tratamento com 0,05% de HgCl_2 , na primavera foi significativamente superior à do outono (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Com a concentração de 0,1% de HgCl_2 , a percentagem de sobrevivência das brotações obtida na primavera foi superior à do outono e inverno (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Dos tratamentos realizados no outono e no inverno, as percentagens de sobrevivência obtidas com 0,05% foram significativamente superiores às da concentração de 0,025% (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 14).

Os dados apresentados nas figuras 3 e 4 mostram que a primavera e o verão foram as melhores épocas do ano de 1993 para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa com HgCl_2 . A análise de todas as variáveis avaliadas indicaram que o tratamento com 0,05% de HgCl_2 , durante 10 minutos foi o mais eficiente para a desinfestação das brotações apicais no ano de 1993.

TABELA 14. INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DO ANO NA SOBREVIVÊNCIA (%) DAS BROTAÇÕES APICAIS *A. polyneuron* DESINFESTADAS COM HgCl_2 .

Época do ano	Concentração (%)		
	0,025	0,05	0,1
Verão	73,93 a ¹	79,90 a b	76,37 a b
Outono	58,47 b	70,25 b	66,48 b
Inverno	53,57 b	76,79 a b	67,65 b
Primavera	79,49 a	84,10 a	80,20 a

¹Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey, ($P \leq 0,05$).

De uma maneira geral, os tratamentos de desinfestação realizados nos anos de 1992 e 1993 foram eficientes possibilitando elevadas taxas de sobrevivência das brotações (70-95%), indicando com isso, que podem ser obtidas culturas assépticas durante o ano inteiro. Essa é uma das vantagens de utilizar técnicas de micropropagação para a regeneração *in vitro* de mudas de peroba-rosa. Essa espécie demonstrou ser sensível às concentrações elevadas das soluções desinfestantes e ao tempo de tratamento, sendo utilizadas concentrações mais reduzidas de NaOCl e HgCl_2 do que as utilizadas para muitas espécies, como pode ser observado na tabela 1 (p. 15). Como foi determinado por GEORGE (1993), a concentração e o tempo de exposição aos desinfestantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta apresentando respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não causa danos ou morte dos tecidos. No presente trabalho, a concentração intermediária de HgCl_2 testada (0,05%) foi a que apresentou os melhores resultados, tendo em vista que com a concentração de 0,025% foram obtidas as maiores percentagens de contaminação fúngica e bacteriana e com 0,1% as maiores percentagens de necrose das brotações apicais de peroba-rosa (FIGURAS 3 e 4).

O bicloreto de mercúrio foi mais eficiente do que o hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, no entanto, por ser um produto tóxico, deve ser utilizado com muita cautela, como recomendado por GEORGE (1993). Esse produto vêm sendo utilizado, com sucesso, para muitas espécies lenhosas que apresentavam sérios problemas de contaminação por microorganismos como relatado por BENNETT e DAVIES JR. (1986), CHALUPA (1990), PUROHIT *et al.* (1994) e PATNAIK e DEBATA (1996) (TABELA 1, p.15).

No primeiro ano de avaliação dos tratamentos de desinfestação (1992) com NaOCl ou HgCl_2 , a estação do ano não influenciou os resultados obtidos com a peroba-rosa, como

pode ser visto nas figuras 1 e 2. No entanto, no ano de 1993, os tratamentos realizados na primavera e verão foram os que apresentaram as maiores taxas de sobrevivência dos explantes (>80%), apesar de que em todas as estações do ano também foram obtidos resultados satisfatórios (50 a 85%). Resultados semelhantes aos da peroba-rosa foram obtidos por HUTCHINSON (1984), com explantes de brotações de maçã que contaminavam menos na primavera ou verão, do que no outono ou inverno. Geralmente, os níveis de contaminação são mais baixos quando as plantas estão na fase de crescimento ativo. QURAISHI *et al.*, (1996) também constataram que a contaminação das culturas de *Cleistanthus collinus* dependia da estação do ano, sendo que a taxa máxima ocorreu entre janeiro e julho e a mínima de julho a setembro.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com as recomendações feitas por BONGA (1987), que a retirada de explantes deve ser feita, preferencialmente, a partir de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, após o final da fase de dormência, durante a primavera e verão.

Alguns estudos revelaram que a época de coleta também pode interferir na taxa média de regeneração de brotações. MEIER e REUTHER (1994) constataram que as brotações de *Fagus sylvatica* coletadas no verão induziram maiores taxas médias de regeneração *in vitro* quando comparadas com as do inverno.

Neste estudo, as brotações apicais de peroba-rosa foram eficientes no estabelecimento de culturas assépticas (FIGURA 17A), permitiram a regeneração de brotações axilares e o enraizamento em meio de cultura WPM. As brotações apicais também foram eficientes para o estabelecimento e indução de brotações múltiplas de *Quercus robur* (VIEITEZ *et al.*, 1985), *Eucalyptus microcorys*, *Banksia serrata* e *B. oblongifolia* (NICCOL *et al.*, 1994) e *Fagus sylvatica* (MEIER e REUTHER, 1994).

5.1.2 Estágio 2: Obtenção de brotações múltiplas

5.1.2.1 Avaliações preliminares

As brotações apicais de peroba-rosa foram colocadas inicialmente no meio de cultura MS, e após o estabelecimento *in vitro*, apresentaram necrose da gema apical e abscisão foliar. Ao contrário do observado com o meio de cultura WPM, no qual as brotações eram vigorosas, apresentavam folhas expandidas e crescimento rápido, além de que, muitas brotações enraizaram (FIGURA 19A). Essa formulação salina passou a ser utilizada nas demais etapas da micropropagação da peroba-rosa (ANEXO 1). O meio MS apresenta concentrações

elevadas de macronutrientes e micronutrientes, as quais podem contribuir para a necrose dos explantes. Segundo PREECE (1995), isso pode ser corrigido reduzindo o nível de nutrientes do meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos para *Halesia carolina* (BRAND e LINEBERGER, 1986) e *Platanus acerifolia* (GIULEVA e ATASANOV, 1994), para as quais as formulações salinas diluídas apresentaram resultados melhores do que a do meio de cultura MS. As culturas no início se desenvolviam no meio basal MS, mas nas etapas seguintes necrosavam. PREECE (1995) estudando a relação entre os sais nutrientes e os reguladores de crescimento, relataram que a otimização dos níveis de nutrientes pode reduzir as concentrações de reguladores de crescimento exógenos adicionados nos meios de cultura. No entanto, muitos estudos sustentam a conclusão de que essas substâncias de crescimento exógenas só compensam parcialmente os desequilíbrios nutricionais dos meios de cultura. Desse modo, os sais nunca irão substituir os reguladores de crescimento e vice-versa.

Testes preliminares indicaram que somente concentrações reduzidas de TDZ foram eficientes na indução de brotações múltiplas de peroba-rosa. O TDZ apresentou uma atividade citocinínica mais potente, sendo que para as brotações coletadas de mudas de dois anos de idade, a concentração de 0,25 μM induziu o desenvolvimento de 2 a 4 brotações axilares que alongaram, quando foram transferidas para meio basal WPM, acrescido de 0,1% de carvão ativado (FIGURA 17I). Por outro lado, o efeito das concentrações elevadas de TDZ (4,4 – 8,8 μM) foi de induzir brotações adventícias sobre um calo bem desenvolvido e essas brotações não alongavam. Essa resposta foi observada tanto para os explantes obtidos de mudas de dois anos de idade, como também para explantes do epicótilo de sementes de peroba-rosa germinadas *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos para *Camptotheca acuminata*, na qual o TDZ apresentou um efeito negativo de inibição de crescimento e de formação de calo na base dos explantes (JAIN e NESSLER, 1996). Segundo HUETTEMAN e PREECE (1993), a concentração de TDZ é um fator crítico na regeneração de brotações, de modo que concentrações reduzidas (<1 μM) apresentam efeito indutor de brotações axilares e as elevadas (>1 μM) resultam na produção de brotações axilares e adventícias, como foi observado em testes preliminares com a peroba-rosa. A falta de alongamento das brotações induzidas em meio de cultura com TDZ tem sido relatado para muitas espécies lenhosas e os mesmos autores sugeriram a transferência para meio de cultura sem TDZ ou com outro balanço de reguladores de crescimento. O mecanismo de ação do TDZ ainda não foi bem elucidado. Segundo MOK *et al.* (1987), as feniluréias estimulam a biossíntese ou alteram o metabolismo das citocininas e também podem modular os níveis endógenos das auxinas.

Brotações apicais de peroba-rosa testadas em meios de cultura suplementados com 4,4 e 8,8 μM de BAP induziram taxas médias de regeneração mais elevadas do que os crescidos de Cin ou ZEA e as brotações obtidas eram de melhor qualidade e mais alongadas do que as regeneradas em meios de cultura com TDZ. MACKAY *et al.* (1995) e JAIN e NESSLER (1996) também obtiveram resultados melhores com BAP, ao invés do TDZ na indução de brotações múltiplas, principalmente considerando a qualidade e alongamento das brotações.

As concentrações de BAP testadas para a peroba-rosa indicaram que ocorreu um aumento na taxa média de regeneração de brotações, com o aumento da concentração e que foi inversamente proporcional ao alongamento. Os níveis de BAP entre 1 μM e 2,25 μM induziram a formação de 2 a 4 brotações por explante, mais alongadas do que quando utilizou-se concentrações mais elevadas. Esses níveis de BAP, combinados com AIB ou ANA (0,05 e 0,5 μM), não interferiram na indução e alongamento de brotações (FIGURA 17J). Isso também foi observado para Cin e ZEA, quando testadas em brotações apicais de mudas de dois anos de idade de peroba-rosa, no entanto, as brotações eram mais alongadas do que as que se desenvolveram em meio de cultura com BAP (FIGURA 17). As brotações avaliadas em meios basais suplementados com Cin, quando comparadas com ZEA e BAP, apresentaram taxas médias de regeneração mais reduzidas; no entanto, as brotações caracterizaram-se por apresentar folhas bem desenvolvidas e de coloração verde escura (FIGURAS 17B e 17E). Resultados semelhantes foram obtidos por BENNETT *et al.* (1994), com taxas médias de regeneração de brotações de *Eucalyptus globulus* muito baixas, cultivadas em meio de cultura com Cin; no entanto, as brotações eram mais longas e com folhas mais verdes.

O 2-iP não foi eficiente na indução de brotações múltiplas em brotações apicais de mudas de dois anos de peroba-rosa e em explantes oriundos da região do epicótilo de peroba-rosa. Para outras espécies, como *Albizia julibrissin*, esse fitoregulador também não induziu a regeneração de brotações (SANKHLA *et al.*, 1994). A taxa de proliferação de brotações, geralmente, depende da concentração da citocinina aplicada (GEORGE, 1996). As concentrações testadas no presente trabalho variaram entre 0,05 e 13,5 μM ; no entanto, para muitas espécies relatadas por GEORGE (1996), foram utilizadas concentrações médias de 31,2 μM de 2-iP nos dois primeiros estágios da micropropagação, sendo necessário serem testadas concentrações mais elevadas para a peroba-rosa.

Considerando os resultados obtidos nas avaliações preliminares desta etapa foram realizados três experimentos de indução de brotações múltiplas de peroba-rosa. Nos dois primeiros foram utilizadas brotações apicais de mudas de dois anos de idade, nos quais testou-

se o efeito de níveis de fitorreguladores nas taxas médias de regeneração e alongamento das brotações. No terceiro experimento testou-se o efeito da BAP, combinado ou não com AIB ou ANA, na indução de brotações múltiplas de explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes de peroba-rosa germinadas *in vitro*. Com esses explantes não foram testados outros fitorreguladores porque os testes preliminares indicaram que somente a BAP apresentou resultados satisfatórios na indução de brotações múltiplas.

5.1.2.2 Experimento 1: Efeito da ZEA, BAP e Cin na indução de brotações múltiplas em brotações apicais.

A análise de variância do experimento de indução de brotações múltiplas de peroba-rosa, em explantes coletados de mudas de dois anos de idade, mantidas em casa de vegetação apresentou significância estatística para o fitorregulador, concentração e interação fitorregulador x concentração, no cultivo inicial e nos dois subcultivos avaliados (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 5).

A ZEA foi mais eficiente na indução e desenvolvimento de brotações axilares de peroba-rosa, seguida de BAP e de Cin. No cultivo inicial, as concentrações de 2,2 e 8,8 μM dos fitorreguladores testados apresentaram diferenças significativas nas taxas médias de regeneração de brotações obtidas, sendo que ZEA e BAP foram mais eficientes (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 15).

TABELA 15. TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron* OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM FITORREGULADORES.

Fitorreguladores	Concentrações (μM)			
	0	2,2	4,4	8,8
ZEA	1,38 a ¹	2,42 a	2,53 a	2,95 a
BAP	1,38 a	2,20 a b	2,38 a	3,03 a
Cin	1,38 a	2,00 b	2,32 a	1,95 b

¹ Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

No primeiro subcultivo, o número médio de brotações regeneradas nos meios de cultura, suplementados com 2,2 e 8,8 μM também apresentou diferenças significativas para os três fitorreguladores avaliados, sendo que a Cin induziu a menor taxa média de regeneração de brotações (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 16).

TABELA 16. TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron* OBTIDAS NO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM FITORREGULADORES.

Fitorreguladores	Concentrações (μM)			
	0	2,2	4,4	8,8
ZEA	1,48 a ¹	3,20 a	3,17 a	3,90 b
BAP	1,48 a	2,31 b	3,05 a	4,35 a
Cin	1,48 a	2,03 c	2,93 a	2,45 c

¹ Médias diferentes nas colunas não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

No segundo subcultivo, o número médio de brotações obtidas nos meios basais suplementados com os níveis de fitorreguladores testados apresentou diferenças significativas, sendo que ZEA foi mais eficiente, proporcionando em média 5,12 brotações por explante em meio de cultura WPM, acrescido de 8,8 μM . Com a concentração de 2,2 μM , não ocorreu diferença significativa nas taxas médias de regeneração de brotações obtidas em meios de cultura com ZEA e BAP (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 17).

TABELA 17. TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron* OBTIDAS NO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM FITORREGULADORES.

Fitorreguladores	Concentrações (μM)			
	0	2,2	4,4	8,8
ZEA	1,65 a ¹	3,68 a	3,76 a	5,12 a
BAP	1,65 a	3,53 a	3,30 b	4,63 b
Cin	1,65 a	2,28 b	3,53 a b	3,17 c

¹ Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A análise de regressão dos níveis de fitorreguladores indicou que ocorreu um aumento nas taxas médias de regeneração de brotações axilares obtidas em meios de cultura, suplementados com Cin e ZEA até a concentração de 4,4 μM , tanto no cultivo inicial, como também para os dois subcultivos subseqüentes (FIGURA 5). No entanto, quando BAP foi adicionado no meio basal observou-se uma tendência de aumentar o número médio de brotações formadas, com o aumento de concentração e isso pode ser verificado principalmente no primeiro subcultivo (FIGURA 5B).

Dos fitorreguladores testados para a peroba-rosa, a ZEA foi mais eficiente na indução e desenvolvimento de brotações axilares e isso também foi observado para *Picea glauca*

(ELLIS *et al.*, 1991), *Acer saccharinum* (PREECE *et al.*, 1991) e *Acacia senegal* (BADJI *et al.*, 1993). Segundo TAMAS (1995), a zeatina está entre as citocininas de ocorrência natural mais ativas em promover o crescimento de brotações axilares. As brotações apicais de *Acer saccharinum* produziram maiores taxas médias de regeneração, com brotações mais longas em meio de cultura suplementado com 10 μ M de ZEA (PREECE *et al.*, 1991). O efeito de ZEA, 2-iP e Cin foi de promover maior alongamento das brotações do que a BAP, como foi observado para a peroba-rosa e documentado para outras espécies (BADJI *et al.*, 1993; FRANÇA *et al.*, 1995; PUROHIT e DAVE, 1996). O alongamento das brotações axilares de peroba-rosa reduziu com o aumento de concentração dos fitorreguladores e isso tem sido relatado para muitas espécies, tais como *Cercis canadensis* (MACKAY *et al.*, 1995), *Carpinus betulus* (CHALUPA, 1990).

De uma maneira geral, BAP ou ZEA apresentaram os melhores resultados de indução de brotações múltiplas de peroba-rosa. Resultados semelhantes foram obtidos por FRANÇA *et al.* (1995), os quais constataram que BAP foi mais eficiente do que ZEA e 2-iP na proliferação de brotações de *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão) e as melhores respostas (3,6 brotações por explante) também foram obtidas com concentrações elevadas (13,3 μ M).

Como foi observado no presente trabalho, as concentrações de BAP entre 4,4 e 8,8 μ M também induziram as maiores taxas médias de regeneração de brotações de *Halesia carolina*. Com 4,4 μ M de BAP, as culturas cresceram vigorosamente, produzindo muitas brotações com folhas expandidas. Com 10 μ M de BAP aumentou a taxa média de regeneração, mas as brotações eram menores e possuíam folhas pequenas. Com 2,5 μ M de BAP melhorou a qualidade das brotações; no entanto, foram produzidos números moderados de brotações (BRAND e LINEBERGER, 1986). Para outras espécies como *Cercis canadensis* (MACKAY *et al.*, 1995), *Dalbergia latifolia* (RAI e CHANDRA (1989) e *Morus australis* (PATTNAIK *et al.*, 1996), o número médio de brotações por explante também aumentou com as concentrações crescentes de BAP até 4,4 μ M.

Resultados semelhantes aos da peroba-rosa também foram obtidos com segmentos nodais de *Wrightia tomentosa* (Apocynaceae) (PUROHIT *et al.*, 1994) e *Sterculia urens* (PUROHIT e DAVE, 1996), cultivados em meio de cultura MS, acrescido de 8,8 μ M de BAP, apresentando uma taxa média de regeneração de 4 brotações por explante. Com 4,4 μ M de BAP foram obtidas 3 brotações mais longas. PUROHIT *et al.* (1994) citaram que a

concentração de 8,8 μ M de BAP foi necessária durante o estabelecimento da cultura, para a quebra de dominância apical e indução de brotações e a posterior transferência para meio de cultura com 4,4 μ M de BAP permitiu a obtenção de brotações mais alongadas. BENNETT e DAVIES JR (1986) também obtiveram o maior número médio de brotações regeneradas de segmentos nodais (6,4) de *Quercus shumardii* cultivadas em meio de cultura WPM, líquido, acrescido de 8,9 μ M de BAP.

O efeito da Cin tem sido de promover taxas médias de regeneração baixas de brotações (2-3) ou para algumas espécies de induzir apenas o alongamento de brotações, sendo menos eficiente que BAP, como foi constatado no presente trabalho. Esses resultados foram confirmados para *Eucalyptus globulus* (TRINDADE *et al.*, 1990), *Morus australis* (PATTNAIK *et al.*, 1996), *Cercis canadensis* (MACKAY *et al.*, 1995).

A organogênese em tecidos cultivados *in vitro* está associada a divisões celulares em locais específicos e a formação de centros com atividade meristemática que se desenvolverão em brotações. Os primeiros eventos da organogênese ocorrem em fases baseadas nas respostas dos explantes em cultura. Essas fases são: obtenção de competência ou fase de pré-indução; indução ou fase de determinação e fase de expressão. Uma vez que as células se tornam competentes, elas podem ser induzidas a seguir uma determinada rota morfogênética. Essa indução ocorre por meio de estímulos externos, tais como: reguladores de crescimento no meio de cultura e/ou um balanço entre níveis exógenos e endógenos (THORPE e KUMAR, 1993). De uma maneira geral, os fitorreguladores testados foram eficientes para promover a quebra de dominância apical e o desenvolvimento brotações axilares de perobá-rosa (FIGURA 17). BAP e ZEA proporcionaram as maiores taxas médias de regeneração, nos níveis entre 4,4 e 8,8 μ M, sendo obtidas de 4 a 5 brotações por explante, no segundo subcultivo. Essa taxa pode ser considerada satisfatória para espécies lenhosas, como pode ser visto na tabela 2 (p.19). Brotações mais alongadas (1,0–3,0 cm de comprimento) ocorreram com concentrações mais reduzidas (2,2 μ M) e preferencialmente com ZEA e Cin. As brotações regeneradas apresentaram morfologia externa normal, não eram vitrificadas, não apresentaram sintomas de deficiência nutricional e também não apresentaram problemas de oxidação.

5.1.2.3 Experimento 2: Efeito de combinações de fitorreguladores na obtenção de brotações múltiplas em brotações apicais.

A análise de variância do número médio de brotações obtidas apresentou significância estatística para as combinações de fitorreguladores somente no cultivo inicial (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 6). Os dados apresentados na tabela 18 indicam que o meio de cultura contendo 2,25 μM de Cin e 1,25 μM de AIB apresentou taxas médias de regeneração de brotações superiores às obtidas em meio de cultura contendo 2,25 μM de ZEA e 1,25 μM de AIB (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). No entanto, no primeiro e segundo subcultivo, os explantes inoculados em meios de cultura com combinações de fitorreguladores não apresentaram diferenças significativas do número médio de brotações (Teste de Tukey, $P \geq 0,05$).

TABELA 18. TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron* OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

Fitorreguladores	Cultivo inicial	Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo
2,25 μM ZEA + 1,25 μM AIB	2,00 b ¹	2,67 a	3,67 a
2,25 μM BAP + 1,25 μM AIB	2,17 a b	3,50 a	3,50 a
2,25 μM Cin + 1,25 μM AIB	2,67 a	3,00 a	3,33 a

¹Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As combinações de fitorreguladores testadas para a peroba-rosa induziram a formação de 3 a 4 brotações mais alongadas, que mediam entre 1,0 e 3,0 cm de comprimento, do que às obtidas em meios de cultura suplementados com concentrações mais elevadas de substâncias com atividade citocinínica (5 e 10 μM), facilitando com isso a transferência para a etapa seguinte de enraizamento (FIGURA 17J). A maioria das brotações regeneradas em meio basal, suplementado com 10 μM de BAP, mediam entre 0,5 e 1,0 cm de comprimento, necessitando de subcultivo para meio de alongamento, antes da indução de raízes. Resultados semelhantes foram obtidos com *Cleistanthus collinus*, com brotações mais longas induzidas em meios de cultura acrescidos de 2,2 μM de BAP (QURAISHI *et al.*, 1996). TRINDADE *et al.* (1990) constataram que níveis baixos de BAP (0,4 e 1,1 μM), combinados com concentração elevada de auxina (2,5 μM de AIB) estimularam a multiplicação de *Eucalyptus globulus* e o efeito das auxinas, provavelmente foi de compensar os níveis baixos

de citocininas. DECLERCK e KORBAN (1994) constataram que no período de estabelecimento da cultura de *Cornus florida*, os meios de cultura contendo AIB estimularam um incremento na produção de brotações axilares com os níveis mais elevados de BAP ($\geq 3,3 \mu\text{M}$), enquanto que com as concentrações inferiores ($\geq 2,2 \mu\text{M}$ de BAP), a presença de AIB não interferiu na taxa média de regeneração de brotações, como foi observado no presente trabalho, para a peroba-rosa. CHALUPA (1987) também testou o efeito de diferentes citocininas: Cin, BAP, 2iP e ZEA na multiplicação de *Quercus*, *Castanea*, *Fraxinus*, *Betula* e *Carpinus* sendo que as concentrações mais reduzidas de BAP ($0,88\text{--}4,44 \mu\text{M}$) produziram as maiores taxas de multiplicação.

HUETTEMAN e PREECE (1993) sugeriram que deveria ser utilizado um meio de cultura primário para indução de taxas elevadas de regeneração de brotações e depois os tufos de brotações poderiam ser transferidos para meios de cultura secundários com outras combinações de reguladores de crescimento. Assim, os explantes de peroba-rosa poderiam ser induzidos a regenerar brotações em meio de cultura WPM, contendo $8,8 \mu\text{M}$ de BAP e depois transferidos para meio de cultura contendo $2,25 \mu\text{M}$ de BAP e $1,25 \mu\text{M}$ de AIB para promover o alongamento dos tufos de brotações. A preferência pelo BAP, em vez da ZEA ocorreu devido ao custo mais baixo desse fitorregulador.

5.1.2.4 Experimento 3: Efeito de fitorreguladores na indução de brotações múltiplas em explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas *in vitro*.

A análise de variância do número médio de brotações obtidas pelos explantes do epicótilo de sementes germinadas *in vitro* não foi significativa para BAP, AIB ou ANA e para interação entre esses fatores, no cultivo inicial e primeiro subcultivo (Teste F, $P \geq 0,05$) (ANEXO 7).

O número médio de brotações induzidas no cultivo inicial e primeiro subcultivo foi muito baixo nos tratamentos testados (TABELA 19; FIGURAS 6 A e 7 A). No segundo e terceiro subcultivo das brotações para meios de cultura de obtenção de brotações múltiplas, as concentrações de BAP apresentaram diferenças significativas do número médio de brotações formadas (Teste F, $P \leq 0,01$) (ANEXO 7). A adição de AIB ou ANA nos meios de cultura contendo BAP não interferiu no número médio de brotações regeneradas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \geq 0,05$). No entanto, as taxas médias de regeneração de brotações aumentaram significativamente com o aumento da concentração de BAP, principalmente com

10 μM , independente da presença ou não de AIB ou ANA (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 19, FIGURA 8A).

No terceiro subcultivo, o tratamento com 10 μM de BAP apresentou diferenças do número médio de brotações obtidas, sendo que com a presença de ANA ocorreu uma redução no número médio de brotações (Teste F, para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). No entanto, para as concentrações de 2,5 e 5,0 μM de BAP, a presença de auxina não interferiu nas taxas médias de regeneração de brotações (TABELA 19, FIGURA 9A). Com relação as concentrações de BAP testadas, também observou-se um aumento do número médio de brotações formadas com o aumento das concentrações (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 19, FIGURA 9A).

TABELA 19. TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, PROVENIENTES DO EPICÓTILO E OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM BAP, COMBINADO OU NÃO COM AIB OU ANA.

BAP (μM)	0				AIB (0,5 μM)				ANA (0,5 μM)			
	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃
0	1,00	1,00	1,00	1,03	1,00	1,03	1,03	1,03	1,00	1,00	1,00	1,00
2,5	1,00	1,03	1,13	1,67	1,00	1,03	1,20	1,83	1,00	1,00	1,07	1,40
5,0	1,03	1,17	1,70	3,50	1,00	1,00	1,67	3,20	1,00	1,03	1,50	3,13
10,0	1,00	1,00	2,90	7,50	1,00	1,10	2,63	7,80	1,00	1,13	2,87	6,97

S₀= cultivo inicial S₁= primeiro subcultivo S₂= segundo subcultivo S₃= terceiro subcultivo

A presença de AIB ou ANA, nos meios de cultura suplementados com BAP, não interferiu significativamente no número médio de brotações regeneradas de peroba-rosa, provenientes da região do epicótilo. No cultivo inicial e no primeiro subcultivo, as taxas médias de regeneração de brotações do epicótilo foram extremamente baixas, como pode ser visto nas figuras 6A e 7A. A análise de regressão indicou que ocorreu um incremento no número médio de brotações, com o aumento da concentração de BAP até 10,0 μM e no terceiro subcultivo ocorreram as maiores taxas médias de regeneração de brotações (FIGURAS 8 A e 9A). Resultados semelhantes foram obtidos com explantes do epicótilo de *Alnus cremastogyne*, para os quais não ocorreu regeneração e alongamento de brotações em meio de cultura WPM, suplementado com 2 a 8 μM de BAP, por um período de oito semanas. Brotações adventícias (9,7) se desenvolveram quando os explantes foram inoculados em meio

de cultura, acrescido de 8 μM BAP e subcultivado para meio de cultura, suplementado com 1 μM de BAP (TANG *et al.*, 1996).

No cultivo inicial e primeiro subcultivo dos explantes do hipocótilo de peroba-rosa, a BAP influenciou significativamente o número médio de brotações formadas, ao contrário do que foi observado para os explantes da região do epicótilo (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 8). De uma maneira geral, a taxa média de regeneração de brotações foi baixa no cultivo inicial e a adição de AIB ou ANA nos meios de cultura com BAP não interferiu no número médio de brotações múltiplas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \geq 0,05$). No entanto, ocorreu um incremento no número médio de brotações regeneradas com o aumento da concentração de BAP (Teste F para contrastes ortogonais, $P \geq 0,05$) (TABELA 20, FIGURA 6B).

TABELA 20. TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, PROVENIENTES DO HIPOCÓTILO E OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL, NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM BAP, COMBINADO OU NÃO COM AIB OU ANA.

BAP (μM)	0				AIB (0,5 μM)				ANA (0,5 μM)			
	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃
0	1,07	1,15	1,15	1,15	1,00	1,07	1,07	1,07	1,00	1,07	1,00	1,00
2,5	1,05	1,17	2,32	2,52	1,07	1,32	2,00	2,32	1,17	1,35	1,82	2,30
5,0	1,15	1,70	3,10	3,90	1,02	1,70	2,82	4,05	1,12	1,70	3,02	5,07
10,0	1,42	2,20	3,72	6,92	1,32	1,97	3,37	5,87	1,35	1,87	3,24	6,95

S₀= cultivo inicial S₁= primeiro subcultivo S₂= segundo subcultivo S₃= terceiro subcultivo

No primeiro subcultivo, a presença de AIB ou ANA interferiu no número médio de brotações regeneradas em meios de cultura, acrescidos de 10,0 μM de BAP, sendo que o efeito do AIB e do ANA foi de reduzir o número médio de brotações (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 20). A comparação de todos os tratamentos indicou que quanto maior a concentração de BAP, maior é o número médio de brotações formadas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (TABELA 20, FIGURA 7B).

A análise de variância do segundo subcultivo de segmentos do hipocótilo de peroba-rosa apresentou significância estatística para as concentrações de BAP e para a presença de AIB ou ANA (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 8). A adição de 0,5 μM de AIB ou ANA nos meios de cultura acrescidos de BAP reduziu o número médio de brotações, quando combinados com

as concentrações de 2,5 e 10,0 μM (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). Os dados apresentados na tabela 20 mostram que ocorreu um aumento do número médio de brotações com o aumento da concentração de BAP (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$) (FIGURA 8B).

No terceiro subcultivo de multiplicação, as concentrações de BAP, a presença de AIB ou ANA e a interação entre esses fatores influenciaram significativamente o número médio de brotações formadas (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 8). A presença de AIB ou ANA, combinados com 5,0 ou 10,0 μM de BAP influenciou significativamente o número médio de brotações regeneradas (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$).

A avaliação dos dados da tabela 20 e figura 9b indicam que ocorreu um aumento na taxa média de regeneração de brotações com o aumento da concentração de BAP, como também foi observado nos outros subcultivos avaliados (Teste F para contrastes ortogonais, $P \leq 0,05$). Os explantes oriundos do hipocótilo apresentaram taxas médias de regeneração mais elevadas, quando comparadas com as do epicótilo e isso foi observado em todos os tratamentos de fitorreguladores, tanto no cultivo inicial, como também nos dois primeiros subcultivos (FIGURAS 6-8). No terceiro subcultivo, somente os tratamentos com a concentração de 10,0 μM de BAP proporcionaram o maior número médio de brotações nos explantes do epicótilo, quando comparados com os do hipocótilo (FIGURAS 9A e 9B). As diferenças das respostas dos explantes do epicótilo e hipocótilo podem ser atribuídas aos efeitos da dominância apical nas brotações apicais, cujas taxas de multiplicação podem ser aumentadas removendo o ápice e pela presença de gemas axilares em um estágio de desenvolvimento mais avançado nos segmentos basais (SANCHEZ *et al.*, 1997). Segundo PATTNAIK *et al.* (1996), essa resposta morfogénica pode estar relacionada com as diferenças entre os estados fisiológicos das brotações nas diferentes regiões de um caule.

Dos tratamentos testados constatou-se que no cultivo inicial e no primeiro subcultivo, a taxa média de regeneração de brotações foi muito baixa, independente da região de origem dos explantes de plântulas de peroba-rosa germinadas *in vitro*. A indução de brotações múltiplas foi dependente da presença de BAP no meio de cultura. No terceiro subcultivo foram obtidos resultados satisfatórios de indução de brotações (7 a 8), em meios de cultura suplementados com a maior concentração de BAP (10,0 μM). Como pode ser observado nas tabelas 19 e 20, de um modo geral, a presença de AIB ou ANA nos meios de cultura acrescidos de BAP, reduziu o número médio de brotações formadas, tanto para os explantes

oriundos da região do epicótilo, como do hipocótilo. Segundo THORPE *et al.* (1991), o número de brotações produzidas é limitado pelo número de gemas axilares colocadas inicialmente em cultura. Apesar das taxas de multiplicação iniciais serem baixas ocorrem aumentos durante os primeiros subcultivos que se mantêm por muitos subcultivos, como pode ser observado no presente trabalho. Quando explantes ou brotações maduras são colocadas em cultura podem ser identificadas três fases distintas: fase de isolamento, de estabilização e de produção. Durante o período de isolamento o crescimento é rápido, poucas brotações axilares são produzidas e geralmente são a expressão de gemas presentes no explante original. Essas culturas se tornam quiescentes por períodos de tempo que dependem do material inicial. Durante a fase de estabilização, o crescimento é dependente dos meristemas gerados em cultura e os materiais juvenis respondem melhor. Durante a fase de produção, o crescimento e a qualidade das brotações não muda com o subcultivo e as brotações podem ser enraizadas e aclimatizadas. O subcultivo contínuo de brotações apicais, em meio de cultura acrescido de citocinina, resultou na reativação de meristemas em muitas espécies, incluindo *Prunus*, *Eucalyptus*, *Pinus pinaster* e *Sequoia* e o grau de rejuvenescimento também aumentou com o número de subcultivos, como foi observado no presente trabalho com a peroba-rosa (THORPE *et al.*, 1991).

Para muitas espécies, como para *Melissa officinalis* (TAVARES *et al.*, 1996), *Wrightia tinctoria* (PUROHIT e KUKDA, 1994), *Banksia* sp (NICCOL *et al.*, 1994), *Sterculia urens* (PUROHIT e DAVE, 1996), *Castanea sativa* (SANCHEZ *et al.*, 1997), segmentos do nó cotiledonar ou do hipocótilo produziram as maiores taxas médias de regeneração de brotações, em níveis que variaram entre 8,8 a 22,12 μM , como foi observado para a peroba-rosa nos dois primeiros subcultivos.

De uma maneira geral, a presença de 0,5 μM de AIB ou ANA, combinadas com BAP não interferiu significativamente nas taxas médias de regeneração de brotações de peroba-rosa, apesar de que os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura sem AIB ou ANA. Comparando esses dois fitorreguladores, o AIB foi mais eficiente que o ANA e isso também foi observado para outras espécies como *Eucalyptus globulus* (TRINDADE *et al.*, 1995) e *Fraxinus angustifolia* (PEREZ-PARRON *et al.*, 1994). O efeito das auxinas, combinadas com BAP, na inibição da regeneração e desenvolvimento das brotações também foi observado para *Betula celtiberica* (PEREZ e POSTIGO, 1989), *Halesia carolina* (BRAND e LINEBERGER, 1989) e *Cornus florida* (DECLERCK e KORBAN, 1994). Por outro lado, MOHAMED-YASSEEN *et al.* (1995), constataram que o número médio de brotações

regeneradas de *Psidium guajava* não foi afetado significativamente por concentrações de BAP superiores a 4,4 e 13,2 μM ou pela adição de ANA (0,5 μM).

Um outro ponto importante foi levantado por GEORGE (1993), em relação à origem das brotações regeneradas. Infelizmente, nem todas as brotações se originam de gemas axilares. Frequentemente também aparecem brotações adventícias diretamente da brotação cultivada ou indiretamente a partir de calo na base da brotação. Essas brotações adventícias que surgem de um calo não são desejáveis. Normalmente, as brotações de origem axilar são idênticas geneticamente às das plantas que as originaram, enquanto que existe grande probabilidade que as brotações originadas de calos diferem uma das outras, em uma ou mais características. O uso de um protocolo que utilize exclusivamente brotações axilares pode apresentar problemas com plantas que apresentam taxas de multiplicação comparativamente baixas. A formação de calos na base dos explantes de brotações apicais e o desenvolvimento subsequente das brotações adventícias pode ser controlado modificando os reguladores de crescimento no meio de cultura (GEORGE, 1993).

Ao comparar os tipos de explantes testados para a peroba-rosa verificou-se que as brotações apicais da mudas de dois anos de idade regeneraram brotações axilares desde o cultivo inicial, ao contrário das brotações oriundas do epicótilo que apresentaram um incremento no número médio de brotações apenas no segundo subcultivo. Uma provável explicação para essas respostas é que o estado fisiológico e o nível de fitorreguladores endógenos deveria ser diferente nos explantes testados. Segundo LETHAM e PALMI (1983), as citocininas exógenas apresentam efeitos morfológicos diferentes nos tecidos das plantas. Esses efeitos dependem do grau de absorção do meio de cultura, da velocidade e eficiência de transporte dentro dos tecidos, do catabolismo dos reguladores de crescimento e da capacidade do genótipo de metabolizar a citocinina testada (AUER *et al.*, 1992). Além disso, as citocininas exógenas podem interagir com os reguladores de crescimento, alterando o desenvolvimento *in vitro* e existem evidências que as citocininas interferem no metabolismo do ácido indol-3-acético.

5.1.3 Estágio 3: enraizamento

5.1.3.1 Avaliações preliminares

O enraizamento *in vitro* de brotações de peroba-rosa ocorreu na etapa de estabelecimento de culturas assépticas, quando foram inoculadas em meio basal WPM

(FIGURA 19 A) ou no cultivo inicial de brotações no mesmo meio basal WPM, suplementado com 0,5 μ M de AIB ou 0,5 μ M de ANA (FIGURA 19 B).

Os testes preliminares realizados com reduções das concentrações de sais (WPM/2, WPM/4), de sacarose (2%, 1%), combinadas com níveis entre 2,5 e 50 μ M de AIB ou ANA não foram eficientes para indução de raízes, sendo obtidas percentagens baixas de enraizamento (25%). Com o enraizamento realizado em duas etapas foram obtidas percentagens de no máximo 40%, com a concentração de 20 μ M de AIB. Constatou-se também que as brotações tinham que permanecer nesse meio de cultura de indução durante 10 dias, para depois serem transferidas para meio basal, isento de fitorreguladores, para o desenvolvimento de raízes.

Os melhores resultados da indução de raízes em brotações de peroba-rosa foram obtidos com tratamentos pulsos com soluções de AIB, sendo esses tratamentos utilizados nos experimentos subseqüentes de enraizamento. Os níveis de AIB de 0,62 e 1,25mM foram testados previamente em brotações provenientes da região do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas *in vitro* e não foram eficientes para a indução de raízes de peroba-rosa, sendo constatada a necessidade de concentrações mais elevadas de AIB (2,5-10 mM). Esses mesmos níveis também foram testados com ANA e por induzirem a formação de calo na base das brotações, com o desenvolvimento de raízes adventícias na superfície do calo, esse fitorregulador não foi utilizado em outros experimentos.

Baseado nas respostas obtidas em testes preliminares foram estabelecidos quatro experimentos de indução de raízes, onde avaliou-se o efeito dos tratamentos pulsos com soluções de AIB, tanto para as brotações originadas de mudas de dois anos de idade, como também para os explantes de sementes germinadas *in vitro*.

5.1.3.2 Experimento 1: Efeito dos tratamentos pulsos com soluções de AIB no enraizamento *in vitro* de brotações oriundas de mudas de dois anos de idade.

As avaliações dos tratamentos pulsos de imersão das bases das brotações de peroba-rosa com AIB foram significativas para concentração, tempo de tratamento e para interação tempo x concentração (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 9).

Os tratamentos de imersão das bases das brotações em soluções de AIB, durante 15 minutos apresentaram percentagens de enraizamento superiores às dos tratamentos realizados durante 5 minutos, quando se utilizou os níveis de 5 e 10 mM de AIB (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 21).

TABELA 21. ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, SUBMETIDAS AOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB.

Tempo (min.)	Concentrações de AIB (mM)			
	0	2,5	5,0	10,0
5	5,0 a ¹	35,00 a	36,66 b	56,67 b
15	5,0 a	33,33 a	51,67 a	80,00 a

¹Médias diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A análise de regressão observada na figura 10 apresentou significância estatística para a percentagem de enraizamento das brotações obtida após os tratamentos com AIB, de modo que ocorreu um aumento da percentagem proporcional ao aumento da concentração de AIB. O tempo de 15 minutos aumentou a percentagem de enraizamento até a concentração de 10mM de AIB, enquanto que para o tempo de 5 minutos, ocorreu um maior aumento na percentagem de enraizamento até 5 mM de AIB, seguido de uma tendência de estabilização da percentagem de enraizamento para as concentrações mais elevadas. BENNETT e DAVIES JR (1986), apresentaram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho quando foram testados níveis mais reduzidos de AIB em brotações de *Quercus shumardii*. Os resultados indicaram 73% de enraizamento quando a extremidade basal das brotações foi mergulhada em solução de 2,5 mM de AIB durante 15 minutos.

5.1.3.3 Experimento 2: Efeito dos tratamentos pulsos com soluções de AIB (pH-5,6) no enraizamento *in vitro*.

A concentração e o tempo apresentaram significância estatística para a percentagem de enraizamento das brotações tratadas com soluções de AIB (5-10 mM), com pH ajustado em 5,6 (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 10).

A concentração de 10mM de AIB proporcionou a maior percentagem de enraizamento, independente do tempo de tratamento. As percentagens de enraizamento obtidas nos tratamentos realizados durante 15 minutos foram superiores às do tempo de 5 minutos, sendo que com 5 mM ocorreu diferença significativa entre os tempos de tratamento avaliados (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 22).

TABELA 22. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, DO 6º e 7º SUBCULTIVO, TRATADAS COM SOLUÇÕES DE AIB (2,5–10 mM, COM pH AJUSTADO EM 5,6), DURANTE 5 E 15 MINUTOS.

Concentração de AIB (mM)	Enraizamento (%)
2,5	44,17 b ¹
5	51,66 b
10	75,00 a
Tempo (min.)	
5	50,55 b ¹
15	63,33 a

¹ Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As soluções de AIB, com pH ajustado em 5,6 proporcionaram aumentos nas percentagens de enraizamento, quando comparadas com o experimento anterior, no qual o pH das soluções não foi ajustado. No entanto, para o tratamento de 10 mM de AIB, durante 15 minutos, o qual proporcionou a maior percentagem de enraizamento (80%), o pH da solução de AIB não interferiu na resposta de enraizamento. HARTMANN *et al.* (1997) recomendam que o pH do meio de enraizamento deve estar preferencialmente entre 5,5 e 6,5. Como foi relatado por GEORGE (1993), existem muitas pesquisas que mostram que o pH pode influenciar a formação de raízes de algumas plantas *in vitro*, sendo que o pH levemente ácido é preferido para muitas espécies.

5.1.3.4 Experimento 3: Efeito dos tratamentos pulsos com soluções de AIB no enraizamento *in vitro* de brotações originadas do epicótilo e hipocótilo.

O efeito da concentração de AIB e da região que originou os explantes, bem como a sua interação influenciou significativamente a percentagem de enraizamento de peroba-rosa (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 11). As percentagens de enraizamento das brotações oriundas da região do hipocótilo foram significativamente superiores às da região do epicótilo somente quando utilizou-se a solução de 5mM de AIB (Tese de Tukey, $P \leq 0,05$) (TABELA 23). A análise de regressão mostra que da concentração de 2,5mM até 5mM de AIB ocorreu um aumento significativo da percentagem de enraizamento, tanto para os explantes da região do epicótilo, como do hipocótilo, seguida de uma tendência de estabilização da percentagem de enraizamento com concentrações mais elevadas (10 mM) (FIGURA 12).

TABELA 23. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron* ORIGINADAS DA REGIÃO DO EPICÓTILO E HIPOCÓTILO E SUBMETIDAS A TRATAMENTOS PULSOS COM AIB DURANTE 15 MINUTOS.

Concentrações (mM)	Regiões	
	Epicótilo	Hipocótilo
0	0,00 a ¹	0,00 a
2,5	18,27 a	21,62 a
5,0	53,33 b	63,34 a
10,0	60,00 a	56,67 a

¹Médias diferentes nas linhas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

PUROHIT e DAVE (1996) obtiveram resultados semelhantes aos da peroba-rosa (60% de enraizamento) com tratamentos pulsos de 2,5 mM de AIB, durante 10 minutos, em brotações do nó cotiledonar de *Sterculia urens*. Os tratamentos pulsos melhoraram as respostas de enraizamento e reduziram a formação de calo na base das brotações.

5.1.3.5 Efeito das condições de luminosidade no enraizamento *in vitro*.

As brotações de peroba-rosa, originadas nas regiões do epicótilo e hipocótilo que foram tratadas com 10 mM de AIB, durante 15 minutos, mantidas em diferentes condições de luminosidade não apresentaram significância estatística para a percentagem de enraizamento e para o número médio de raízes (Teste F, $P \leq 0,05$) (ANEXO 12). No entanto, as brotações mantidas na ausência de luz, durante 7 dias apresentaram percentagens de enraizamento e o número médio de raízes superiores aos demais tratamentos, tanto para as brotações originadas da região do epicótilo, como também do hipocótilo. As médias obtidas para a região do hipocótilo foram superiores às do epicótilo (TABELA 24).

Dos experimentos de enraizamento realizados, constatou-se que, o tratamento de imersão das bases das brotações de peroba-rosa com 10mM de AIB, durante 15 minutos foi satisfatório para a indução e desenvolvimento de raízes, tanto para as brotações provenientes de mudas mantidas em casa-de-vegetação, como também para as originadas de sementes germinadas *in vitro*. As brotações oriundas da região do hipocótilo apresentaram maiores percentagens de enraizamento do que às do epicótilo. As respostas às condições de luminosidade testadas no enraizamento não apresentaram diferenças significativas, indicando

com isso que o enraizamento pode ser realizado *ex vitro*, que é uma vantagem num protocolo regenerativo, porque reduz o custo, a mão de obra e permite que a aclimatização e o desenvolvimento de raízes ocorram simultaneamente, como foi citado por THORPE *et al.* (1991). Outra consideração importante do enraizamento, com tratamentos pulsos com soluções de AIB é que raramente se forma calo na base dessas brotações, assegurando uma conexão vascular contínua entre a parte aérea e as raízes. O enraizamento *ex vitro* com tratamentos pulsos com soluções de AIB foi eficiente para *Pinus halepensis* Mill. (LAMBARDI *et al.*, 1991) e para outras espécies como pode ser observado na tabela 3 (p.21).

TABELA 24. ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron* ORIGINADAS DO EPICÓTILO E HIPOCÓTILO, TRATADAS COM 10 mM DE AIB E MANTIDAS EM CONDIÇÕES DIFERENTES DE LUMINOSIDADE.

Condições	Epicótilo		Hipocótilo	
	%	Nº de raízes	%	Nº de raízes
Ausência de luz	62,50	1,20	77,78	1,39
Base do frasco sem luz	56,25	1,21	68,89	1,28
Presença de luz	50,00	1,12	66,67	1,22

¹Médias não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

5.1.4 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de mudas

Apesar das brotações de peroba-rosa apresentarem apenas uma ou duas raízes, as mudas plantadas apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 90% (FIGURA 19E). Logo após o plantio, as mudas formaram folhas novas e depois de um período de repouso, iniciaram o crescimento. Após 8 a 12 semanas de permanência em bandejas de semeadura, as mudas apresentaram raízes bem desenvolvidas e foram transplantadas para sacos plásticos, permanecendo ainda em casa-de-vegetação climatizada (FIGURAS 19F e 19G). Algumas mudas de peroba-rosa que estavam crescendo em sacos plásticos apresentaram ramificações laterais, provavelmente provenientes do efeito residual dos fitorreguladores utilizados na etapa de obtenção de brotações múltiplas (FIGURA 19G). Segundo PREECE (1991), as técnicas de micropropagação freqüentemente resultam na produção de plantas com maior ramificação basal, que sofrem alterações no crescimento total do caule, quando comparadas com as técnicas de propagação tradicional. Uma vantagem dessas plantas que apresentam maior ramificação é que as estacas caulinares coletadas de plantas micropropagadas enraizam mais rápido do que as retiradas de plantas propagadas por sementes ou por estaquia.

A figura 13 apresenta um protocolo de regeneração *in vitro* de peroba-rosa pela rota organogenética. A utilização desse protocolo nos permite fazer uma previsão do número de mudas regeneradas *in vitro*, após um período de seis meses, considerando que a eficiência de cada etapa seja de 70%. Se forem selecionadas 100 brotações apicais, submetidas à tratamento de desinfestação (0,05% de HgCl₂, 10 minutos) e subcultivadas para as seguintes etapas *in vitro*: indução de brotações múltiplas (meio de cultura WPM, contendo 8,8µM de BAP, no cultivo inicial e em dois subcultivos subsequentes, com taxas médias de regeneração de 3; 4 e 4,5 brotações), alongamento (meio de cultura WPM, acrescido de 2,25 µM de BAP e 1,25µM de AIB, durante um mês, com uma taxa média de regeneração de 3,5 brotações), indução de raízes (tratamento pulso com solução de 10 mM de AIB, durante 15 minutos, com 70% de enraizamento) e transplântio e aclimatização em casa de vegetação (70% de sobrevivência), poderia ser previsto a obtenção de 1667 mudas de peroba-rosa após um período de seis meses.

5.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

5.2.1 Avaliações preliminares

A peroba-rosa frutifica abundantemente a cada quatro anos. Nos anos de 1994 e 1995 houve dificuldade de obtenção de frutos porque a mesma não frutificou em vários locais, tais como Cianorte-PR, Londrina-PR, Maringá-PR e Telêmaco Borba-PR. Apenas uma árvore pertencente a Sede do Instituto Florestal de São Paulo apresentou frutificação, da qual foram coletados frutos maduros, contendo sementes maduras, cujos embriões foram utilizados em testes preliminares de indução de embriões somáticos.

Inicialmente, foram realizados alguns testes para determinar tratamentos de desinfestação eficientes e as melhores condições ambientais para o estabelecimento das culturas *in vitro*. Os embriões isolados de sementes poliembriônicas de peroba-rosa não apresentaram problemas de contaminação fúngica, bacteriana e de oxidação fenólica, facilitando com isso o estabelecimento *in vitro*. O tratamento com solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 20 minutos foi eficiente para desinfestação das sementes, sendo obtidas percentagens de sobrevivência superiores a 90%. Quanto às condições de luminosidade, constatou-se que a ausência de luz foi benéfica nas etapas de indução, manutenção e multiplicação das culturas embriogenéticas. As etapas de maturação e conversão dos embriões somáticos em plantas foram realizadas na presença de luz e com fotoperíodo de 16 horas. Conforme GUERRA *et al.* (1999), em geral, o processo de indução e iniciação de embriões

somáticos é realizado no escuro, mesmo sabendo-se que a luz afeta o desenvolvimento dos embriões somente após a iniciação.

As sementes de peroba-rosa apresentaram variação do número de embriões (2 a 6), sendo um maior e outros menores e de formas irregulares (FIGURA 15E). Ainda não foi estudada a origem desses embriões. Geralmente o nucelo origina embriões de sementes poliembriônicas e os embriões nucelares são distintos do zigótico por apresentarem formas irregulares, ausência de suspensor e forma variável, como foi constatado para várias famílias, tais como: Acanthaceae, Amaryllidaceae, Bombacaceae, Cactaceae, Liliaceae e Gramineae (TISSERAT *et al.*, 1979 e SOUZA e MOSCHETA, 1992).

Para este estudo da embriogênese zigótica e somática de peroba-rosa, os embriões foram individualizados e identificados conforme o tamanho e verificou-se que ocorreu indução de embriões somáticos, independente do tamanho do embrião inoculado. No entanto, com maior frequência nos embriões menores, indicando com isso, que esses eram mais imaturos. Isso está de acordo com o que foi relatado por TISSERAT *et al.* (1979) que em cada rudimento seminal (óvulo) é formado mais do que um embrião e não ocorre sincronia no seu desenvolvimento. Assim, um rudimento seminal pode conter embriões em vários estádios de desenvolvimento e nem todos amadurecem, como foi constatado para *Pachira oleaginea* (BAKER, 1960) e *Euonymus japonica* (COPELAND, 1966).

A inoculação dos explantes de peroba-rosa em meios de cultura de consistência semi-sólida (0,45% de ágar) foi testada previamente e permitiu um melhor desenvolvimento das culturas, quando comparada com meios de cultura de consistência sólida (0,65% de ágar), sendo utilizada nos experimentos de indução de embriões somáticos.

As concentrações elevadas de sacarose (6, 9 e 12%), combinadas com 2,4-D (2,5-10 μ M) e Cin (0,5-2,5 μ M) não induziram respostas desejáveis na etapa de indução da embriogênese somática. Foram visualizados embriões somáticos mal formados, tubulares, de morfologia alterada, na região do nó cotiledonar dos embriões imaturos inoculados, não sendo aconselhada a utilização desses níveis de sacarose nessa etapa inicial.

Outras auxinas, como picloram e ANA foram testadas previamente na etapa de indução de embriões somáticos de peroba-rosa e não apresentaram resultados favoráveis para expressão desta rota morfogenética, optando-se pela utilização do 2,4-D para os experimentos subsequentes. Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies, tais como: *Elaeis guineensis* (TEIXEIRA *et al.*, 1993), *Thevetia peruviana* (SHARMA e KUMAR, 1994) e

Euterpe edulis (GUERRA e HANDRO, 1998), nas quais o único fitorregulador eficiente para indução de embriões somáticos foi o 2,4-D.

5.2.2 Indução e iniciação de culturas embriogenéticas

5.2.2.1 Fonte de explantes

Quanto às fontes de explantes testadas no presente trabalho, apenas os embriões maduros e imaturos permitiram a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. Para folhas novas (três semanas de idade), coletadas em casa de vegetação e partes de plântulas obtidas após três semanas da germinação *in vitro* de sementes de peroba-rosa, tais como: extremidades de raízes, secções do hipocótilo, cotilédones e discos foliares não foi observada a indução e expressão de embriões somáticos. Com as extremidades de raízes observou-se apenas a expansão e crescimento dos explantes inoculados, com um início de formação de calo, que oxidou após um longo período de permanência (24 semanas) no meio de cultura. As secções de hipocótilo formaram calos compactos, pequenos, de coloração branca-acinzentada que começaram a se desenvolver nas extremidades dos explantes. Os cotilédones e folhas novas induziram a formação de calos maiores, de coloração amarelada para marrom, os quais apresentavam algumas regiões de textura granular fina, compacta, caracterizando calos não embriogenéticos (FIGURA 20A). Os explantes que permaneceram por um longo período no meio de cultura de indução (12 a 16 semanas) e depois foram subcultivados para o mesmo meio de cultura continuaram formando calos compactos que com o decorrer do tempo oxidaram e foram descartados. A transferência para meios de cultura, suplementados com fitorreguladores com atividade citocinínica e ANA também não permitiram a expressão de rotas organogenéticas ou embriogenéticas.

As condições intrínsecas e extrínsecas dos explantes de peroba-rosa oriundos de plântulas germinadas *in vitro* não permitiram que ocorresse indução da embriogênese somática. Nas condições testadas no presente trabalho, os explantes de plântulas não adquiriram competência e determinação para indução e expressão da rota embriogenética, sendo necessárias mais investigações do estado fisiológico dos explantes, das combinações de fitorreguladores e das formulações salinas. Como tem sido relatado para muitas espécies, os embriões imaturos de peroba-rosa induziram os padrões diretos e indiretos de embriogênese somática, com as maiores frequências de respostas embriogenéticas, enquanto que os embriões maduros apresentaram apenas o padrão indireto, induzindo, inicialmente, uma massa celular embriogenética, com embriões somáticos se desenvolvendo em sua superfície

(FIGURA 20B). As respostas das fontes de explantes no processo da embriogênese somática da peroba-rosa estão de acordo com o que foi proposto por SHARP *et al.* (1980) e WILLIAMS e MAHESWARAN (1986). Os tecidos de embriões zigóticos imaturos já são embriogênicos por natureza, apresentando condições meristemáticas, e, aparentemente, necessitam de menos suplementos do que outros explantes contendo tecidos somáticos para indução de respostas embriogênicas. Quando embriões maduros ou plântulas são utilizados como fontes de explantes, o tecido epidérmico ainda encontra-se imaturo, ocorrendo uma embriogênese somática de origem multicelular a partir da epiderme imatura. Para situações onde tecidos maduros ou completamente diferenciados foram utilizados como explantes, a embriogênese somática só foi possível pela redeterminação das células diferenciadas e da proliferação de calos.

5.2.2.2 Meio de cultura

A indução de embriões somáticos de peroba-rosa ocorreu nas três formulações de meios de cultura testadas (WPM, LPm e MS); no entanto, com maior frequência para a formulação LPm, que passou a ser utilizada para as demais etapas da embriogênese somática. O meio basal WPM, suplementado com Gln (0,05%) e CH (0,05%) também foi eficiente principalmente quando foram inoculados embriões imaturos. Resultados semelhantes foram obtidos por DAL VESCO (1998), que também comparou essas três formulações salinas para indução de embriões somáticos de *Feijoa sellowiana*, constatando um maior número de embriões somáticos formados no meio basal LPm. A formulação salina LPm também tem apresentado bons resultados na indução e desenvolvimento de embriões somáticos de coníferas, principalmente com espécies do gênero *Picea*, tais como: *Picea glauca* e *Picea engelmannii* (ROBERTS *et al.*, 1990), *Picea rubens* (HARRY e THORPE, 1991), *Picea glauca engelmannii* (CARRIER *et al.*, 1997) e *Araucaria angustifolia* (ASTARITA e GUERRA, 1998).

No presente trabalho, os embriões imaturos inoculados em meio de cultura MS, com combinações de fitorreguladores induziram a formação de embriões somáticos; no entanto, com menor frequência do que com explantes inoculados nos meios basais LPm e WPM. Ao contrário do que foi relatado por THORPE (1988), que apesar de existirem muitos meios de cultura que podem ser utilizados para a indução da embriogênese somática, em 70% dos casos bem sucedidos utilizou-se os sais do meio de cultura MS ou suas modificações. A

concentração elevada de sais deste meio basal parece ser muito benéfica para o crescimento de embriões somáticos.

A presença de níveis elevados de nitrogênio é necessária para a indução e diferenciação dos embriões somáticos. Segundo MERKLE *et al.* (1991), os meios basais devem ser suplementados com pelo menos 5-12,5 mM de amônio para a indução de embriões somáticos, apesar de que níveis muito elevados podem inibir a embriogênese somática. Como pode ser observado no anexo 1, as concentrações de nitrato de amônio das formulações salinas dos meios basais MS, LPm e WPM são respectivamente: 20,6; 15,0 e 5,0 mM. Tendo em vista que os meios de cultura ainda foram suplementados com nitrogênio orgânico (CH e Gln 0,05%) é provável que os níveis muito elevados de nitrogênio do meio de cultura MS tenham inibido a indução de embriões somáticos de peroba-rosa. A importância do suprimento de nitrogênio durante a embriogênese somática pode estar relacionada com a sua exigência para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e substâncias de reserva. Uma razão fundamental para a importância do nitrogênio reduzido no metabolismo vegetal, reside no fato de que a amônia é a rota primária pela qual esse elemento é incorporado em compostos orgânicos (GREY *et al.*, 1987). A adição de CH e Gln estimulou a formação e desenvolvimento de embriões somáticos de peroba-rosa. Segundo GEORGE (1996), essas substâncias fornecem ao meio de cultura, principalmente uma maior quantidade de nitrogênio reduzido e a adição de Gln (0,5-1,0 mM) ou CH (500-1000 mg.L⁻¹) aumentam a taxa de proliferação de calos embriogênicos e estimulam o crescimento dos embriões somáticos. THORPE (1994) também já havia relatado que a adição de nitrogênio orgânico é muito utilizada durante o início da formação da massa celular embriogenética e durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. Resultados semelhantes foram obtidos para *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO, 1998), *Abies alba* (HRISTOFOROGLU *et al.*, 1995) e *Eucalyptus* sp. (MURALIDHARAN e MASCARENHAS, 1995).

5.2.2.3 Fitorreguladores

O processo de indução e iniciação de embriões somáticos de *A. polyneuron* ocorreu a partir de embriões maduros e imaturos que foram inoculados em meios de cultura semi-sólidos (WPM, LPm e MS), na presença de 2,4-D, em concentrações que variaram entre 2,25 e 11,30µM, combinadas com concentrações reduzidas de BAP, Cin e TDZ (0,45-2,25µM), Gln (0,05%), CH (0,05%), sacarose (3%) e na ausência de luz. Essas condições

proporcionaram a indução e expressão de rotas de embriogênese somática de peroba-rosa, de baixa frequência das culturas primárias e de forma assíncrona.

A peroba-rosa apresentou os seguintes padrões de expressão da embriogênese somática *in vitro*: embriogênese direta, indireta e repetitiva. A maior parte dos embriões somáticos obtidos *in vitro* foi pelo método indireto.

5.2.2.3.1 Respostas dos embriões maduros às combinações de fitorreguladores

Os embriões maduros de peroba-rosa, coletados em agosto de 1995, apresentaram diferentes respostas morfogênicas que variaram conforme a combinação de fitorreguladores testada. De um modo geral, as formulações de meios de cultura não interferiram nas respostas obtidas, apesar de que a expressão de rotas embriogênicas ocorreu com maior frequência em meio de cultura LPM. As principais respostas morfogênicas são apresentadas na tabela 25.

TABELA 25. RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE EMBRIÕES MADUROS DE *A. polyneuron*.

Combinações de fitorreguladores (μM)	Respostas morfogênicas
- 0 e 0,45 2,4-D + 0,45 Cin, BAP ou TDZ	- Germinação dos embriões
- 4,50 e 11,30 2,4-D + 0,45 Cin, BAP ou TDZ	- Formação de calos compactos de coloração branca, amarela e marrom; - Massas celulares embriogênicas - Embriões somáticos globulares, cordiformes e torpedos (FIGURA 20 B)
- 22,60 2,4-D + 0,45 Cin, BAP ou TDZ	- Calos compactos, pouco desenvolvidos, de coloração amarelada e marrom. Aumento da taxa de oxidação fenólica.

As seguintes combinações de formulações salinas e fitorreguladores permitiram que embriões maduros de peroba-rosa expressassem o padrão indireto de embriogênese somática: LPM, suplementado com 4,50 μM de 2,4-D e 0,45 μM de TDZ ou com 4,50 μM de 2,4-D e 0,45 μM de Cin e WPM, acrescido de 11,30 μM de 2,4-D e 2,25 μM de BAP ou 2,25 μM de 2,4-D e 2,25 μM de Cin.

Os embriões maduros de peroba-rosa que permaneceram de 12 a 18 semanas em meio de cultura LPM, semi-sólido, acrescido de 4,50 μM de 2,4-D e 0,45 μM de TDZ ou Cin, na ausência de luz, formaram calo de coloração marrom escura e uma massa celular embriogênica de coloração branca ou amarelada, com embriões somáticos globulares na sua

superfície que se desenvolveram até o estágio torpedo (FIGURAS 14 e 20B) ou cachos de embriões somáticos globulares (8). O mesmo padrão de resposta ocorreu com os embriões inoculados em meio basal WPM, suplementado com 11,30 μM de 2,4-D e 2,25 μM de BAP. Após a transferência dos explantes para meio basal com 4,50 μM de 2,4-D e 0,45 μM de BAP, observou-se um cacho de embriões somáticos globulares na região cotiledonar (FIGURA 20F).

As massas celulares foram divididas e a região mais compacta e de coloração marrom escura foi subcultivada para o mesmo meio de cultura de indução ou para meio de cultura acrescido de concentrações mais reduzidas (2,25 μM de 2,4-D e 0,45 μM de Cin) (FIGURA 20C). A outra região mais friável, contendo os embriões somáticos foi subcultivada para meio basal LPM, sólido, isento de fitorreguladores ou suplementado com 12,3 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA, na presença de luz. Parte do tecido subcultivado para o mesmo meio de cultura de indução não se desenvolveu e necrosou; no entanto, quando utilizou-se concentrações reduzidas de 2,4-D observou-se a formação e proliferação contínua da massa celular embriogenética. Após o primeiro subcultivo, a massa celular que inicialmente possuía coloração amarelada apresentou setores brancos, translúcidos, de textura granulosa, com embrião somático globular na superfície (FIGURA 20D) e essas características foram mantidas por muitos subcultivos (15), estabelecendo-se linhagens celulares embriogenéticas, subcultivadas a cada 8 semanas.

Observou-se também, mas com menor frequência, que o embrião inoculado em meio de cultura WPM, adicionado de 4,5 μM de 2,4-D e 0,45 μM de BAP formou um embrião somático que se desenvolveu até o estágio cordiforme na superfície de um calo compacto de coloração amarela escura, mas não evoluiu quando transferido para meio de cultura de maturação (FIGURA 21A). Resultados semelhantes foram obtidos por TEIXEIRA *et al.*, (1993), que constataram que embriões somáticos de *Elaeis guineensis* poderiam ser derivados de tecido embriogênico compacto ou de tecido embriogênico friável. No entanto, somente o tecido friável resultava no desenvolvimento de embriões somáticos normais e plântulas.

Os embriões maduros de peroba-rosa, inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 2,25 μM de 2,4-D e 2,25 μM de Cin, formaram calos compactos de coloração marrom escura, com um pouco de massa celular branca na superfície do cotilédone, após um período de 12 semanas. O subcultivo para meio basal, acrescido da mesma concentração de 2,4-D e 0,45 μM de Cin, por um período de 4 semanas, permitiu a proliferação da massa celular embriogenética, sendo posteriormente transferida para meio de

cultura de maturação, suplementado com 2-iP e ANA. Nestas condições, observou-se a indução de embriões somáticos de peroba-rosa em meio de cultura com concentrações salinas, níveis de nitrogênio e níveis de fitorreguladores mais reduzidos do que os níveis de outras formulações de meios basais testados no presente trabalho, indicando com isso, que ocorreu uma interação entre os componentes do meio de cultura. SHARP *et al.* (1980) explicaram que os efeitos das fontes de nitrogênio na embriogênese somática podem ser melhor entendidos depois do estudo de outros componentes do meio de cultura, especialmente o 2,4-D. Nos experimentos que demonstraram uma exigência por amônio para obtenção de embriões somáticos, as concentrações de 2,4-D utilizadas foram de 2,5 a 25 vezes mais altas do que naqueles sem exigência de amônio. Aparentemente, a exigência pelo amônio estava associada com a concentração específica de 2,4-D no meio de cultura. PREECE (1995) também citou que a otimização das concentrações de sais pode reduzir a concentração dos reguladores de crescimento adicionados nos meios de cultura.

De uma maneira geral, os embriões inoculados em meios basais, suplementados com concentrações entre 4,50 e 11,30 μM de 2,4-D, combinadas com 0,45 μM de Cin, BAP ou TDZ, apresentaram maior frequência de respostas morfogénéticas, do que outros níveis de fitorreguladores testados, sendo recomendados para serem utilizados em experimentos subseqüentes de indução de embriões somáticos. O subcultivo das culturas para meios basais acrescidos de concentrações mais reduzidas de 2,4-D (2,25 μM) e Cin (0,45 μM) permitiu o estabelecimento e proliferação de massas celulares, granulosas e de textura friável.

Respostas semelhantes foram obtidas com embriões somáticos de *Thevetia peruviana*, espécie da mesma família da peroba-rosa (Apocynaceae). A taxa mais elevada de proliferação de calos com competência embriogénética ocorreu em meio de cultura MS, acrescido de 4,50 μM de 2,4-D e 0,45 μM de Cin. Concentrações mais elevadas de 2,4-D inibiram o crescimento de calo e a indução embriogénética, sendo que as culturas mantidas em níveis superiores a 22,60 μM não sobreviveram (SHARMA e KUMAR, 1994).

Para outras espécies, como *Quercus suber*, os níveis de 2,3 e 4,5 μM de 2,4-D foram mais eficientes para indução de embriões somáticos (MANZANERA *et al.*, 1993), como também para *Tilia cordata* (CHALUPA, 1990) e *Ceratonia siliqua* (CARIMI *et al.*, 1997). RAO e SITA (1996) também apresentaram resultados semelhantes aos obtidos pela peroba-rosa, com níveis elevados de 2,4-D (22,62 μM) inibindo a indução de embriões somáticos de

Dalbergia latifolia e a melhor combinação de reguladores de crescimento foi a de 9 μM de 2,4-D e 0,45 μM de Cin.

5.2.2.3.2 *Respostas dos embriões imaturos às combinações dos fitorreguladores*

Embriões imaturos inoculados em meio basal LPm, suplementados com 2,4-D (2,5-10 μM), combinados com Cin, BAP ou TDZ (0,5 μM) formaram calos em 40 a 50% das culturas avaliadas, geralmente próximo da região do nó cotiledonar e com crescimento proporcional ao aumento da concentração de 2,4-D.

A combinação de 5 μM de 2,4-D, 0,5 μM de Cin e 0,5 μM de BAP induziu a formação de massas celulares embriogenéticas com embriões somáticos na extremidade do eixo hipocótilo-radícula, no cotilédone e na região do nó cotiledonar (FIGURAS 21D-E). A combinação de 5 μM de 2,4-D e 0,5 μM de TDZ também proporcionou indução e iniciação de embriões somáticos em 20% das culturas primárias. Após oito semanas de permanência nesse meio de cultura, os embriões iniciaram a formação de uma massa celular branca na superfície do cotilédone.

Respostas semelhantes foram obtidas quando embriões imaturos foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com as mesmas combinações de fitorreguladores testadas para o meio basal LPm. Após um mês da inoculação dos embriões foi observada a expansão e crescimento do cotilédone e do eixo hipocótilo-radícula, proporcional ao tamanho do embrião inoculado e em 20 a 30% das culturas foi observado o início de formação de calo. De uma maneira geral, constatou-se que a expressão de rotas embriogenéticas ocorreu no máximo em 20% das culturas primárias inoculadas em meio basal, acrescido de 2,4-D (5 e 10 μM), combinado com Cin, BAP e TDZ (0,5 μM). A indução e o início do desenvolvimento dos embriões somáticos globulares foi observada diretamente na região do nó cotiledonar ou na superfície de uma pequena massa celular branca e com menor frequência sobre o cotilédone. O número de embriões somáticos globulares formados após 12 a 14 semanas no meio de cultura de indução variou entre 3 a 6 e com menor frequência foram visualizados embriões somáticos cordiformes (FIGURAS 21D-G). Observou-se também que a permanência dos embriões somáticos no meio de cultura de indução impediu que ocorresse o desenvolvimento para os estádios subsequentes e na superfície de alguns embriões somáticos ocorreu a formação de massa celular embriogenética friável (FIGURA 21C) ou até mesmo de calos compactos.

Nos embriões imaturos de peroba-rosa, inoculados em meio de cultura MS, também observou-se a indução de embriões somáticos pelo processo direto, com menor frequência do que com as outras formulações salinas testadas (LPm e WPM). Na primeira avaliação realizada após 4 semanas da inoculação, constatou-se apenas a expansão, crescimento do cotilédone e do eixo hipocótilo-radícula e em 20 a 30 % das culturas iniciou a formação de calo, próxima da região do nó cotiledonar e na extremidade do eixo hipocótilo-radícula. Os embriões inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 10 μM de 2,4-D e 0,5 μM de Cin ou 5 μM de 2,4D e 0,5 μM de TDZ formaram embriões somáticos globulares diretamente na região do nó cotiledonar, como pode ser observado nas figuras 21F e 21G.

Essa baixa frequência de indução de embriões somáticos em culturas primárias também tem sido relatada para outras espécies, como: *Juglans regia* (TULECKE e MC GRANAHAHAN, 1985; *Quercus* sp. (GINGAS e LINEBERGER, 1989); *Aesculus hippocastanum* (KISS *et al.*, 1992), nas quais constatou-se que a produção de embriões somáticos na embriogênese primária foi inferior à da secundária. Para *Medicago sativa* somente 5 dos 300 embriões zigóticos inoculados produziram embriões primários, enquanto que todos os embriões somáticos primários iniciaram a formação de embriões secundários (PARROT e BAILEY, 1993) e para *Ceratonia siliqua* somente 16% dos explantes foram responsivos para indução de embriões somáticos (CARIMI *et al.*, 1997).

O aumento das concentrações de Cin, BAP ou TDZ para 2,5 μM , combinadas com os mesmos níveis de 2,4-D (2,5, 5 e 10 μM), adicionados em meios basais, não ocasionou respostas embriogenéticas em embriões imaturos de peroba-rosa, como foi observado nos embriões maduros. Ocorreu uma grande expansão e crescimento dos embriões que formaram calos compactos muito desenvolvidos que oxidaram com o decorrer do tempo. Respostas semelhantes ocorreram quando a concentração das substâncias com atividade citocinínica aumentou para 5 μM . Constatou-se um grande crescimento do cotilédone e do eixo hipocótilo-radícula que ocuparam toda extensão do tubo de ensaio e não havendo espaço para o seu desenvolvimento oxidaram. Observou-se também que o início da formação de calo ocorreu nas extremidades dos cotilédones que apresentaram grande crescimento, quando comparados com o do eixo hipocótilo-radícula, sendo esse desenvolvimento proporcional ao tamanho do embrião inoculado.

A adição de carvão ativado (1%) em meios de cultura acrescidos de concentrações elevadas de 2,4-D (226,25-452,50 μM) e de substâncias com atividade citocinínica (25 μM de Cin, BAP ou TDZ) não foi eficiente para indução e iniciação dos embriões somáticos de

peroba-rosa. Os fitorreguladores estimularam apenas o crescimento dos embriões, proporcional ao tamanho do embrião inoculado e somente nos embriões menores ocorreu a formação de calos, de textura compacta e de coloração amarelada para marrom. Pelo fato dos embriões de peroba-rosa não apresentarem problemas de oxidação, constatou-se que não é necessária a adição de carvão ativado nos meios de cultura de indução, além de que as combinações de fitorreguladores não induziram respostas embriogênicas.

5.2.2.3.3 *Padrões da embriogênese somática*

Foram feitas algumas constatações com relação ao comportamento morfogenético dos embriões somáticos de peroba-rosa. Foram observados os padrões diretos e indiretos de expressão da embriogênese somática, dependendo do estado fisiológico dos embriões somáticos inoculados. A embriogênese somática direta e indireta ocorreu quando embriões imaturos foram inoculados e somente a indireta para os embriões maduros, ou seja, com a formação prévia de uma massa celular embriogênética. GUERRA (1989) obteve os mesmos padrões de resposta com *Euterpe edulis*. Conforme relatos feitos por WILLIAMS e MAHESWARAN (1986), as células de tecidos maduros são heterogêneas quanto à especialização e se diferenciam lentamente, havendo necessidade de redeterminação que só ocorre pela via indireta, com a indução de calos. RAEMAKERS *et al.* (1995) alertaram que nem sempre é possível detectar se ocorre embriogênese somática direta, indireta ou ambas. Em muitos sistemas onde a embriogênese somática foi descrita como indireta, o calo ou massa celular embriogênética estava organizada em embriões somáticos em estádios juvenis (massas pró-embriogênicas ou embriões pró-globulares) (EMONS, 1994). Segundo MERKLE *et al.* (1990), a melhor maneira de definir os padrões diretos e indiretos está relacionada com o estado epigenético das células dos explantes. Desse modo, as células somáticas embrionárias, geralmente, iniciam a embriogênese somática mais facilmente do que as células vegetativas diferenciadas. As células altamente diferenciadas necessitam de maiores mudanças epigenéticas, induzindo a embriogênese indireta. Desse modo, o padrão de embriogênese somática é determinado pela relação da distância epigenética do estado embrionário das células do explante.

No presente trabalho, o período médio para o início dos eventos de indução e expressão da embriogênese somática de peroba-rosa, a partir de embriões imaturos e que permitiu a visualização dos embriões somáticos foi de 4 a 12 semanas após a inoculação em meio de cultura e de 12 a 16 semanas para embriões maduros. Essas observações indicaram

que a peroba-rosa, de uma maneira geral, apresentou respostas lentas e as avaliações passaram a ser feitas a cada quatro semanas. Os explantes permaneceram no meio de cultura de indução e somente depois que ocorreu a expressão da embriogênese somática, ou seja, o aparecimento de embriões somáticos globulares é que eles foram subcultivados para outros meios de cultura. EMONS (1994) e YEUNG (1995) relataram que uma das distinções importantes entre embriogênese somática direta e indireta depende do tempo de desdiferenciação e aquisição da competência. No primeiro caso, as células respondem a tratamentos experimentais e se tornam determinadas num tempo curto, sem a proliferação de calos. No segundo caso, é necessário um tempo mais longo para adquirir o estado competente embriogenético e, muitas vezes, esse estado é precedido pela proliferação celular.

Um outro fator importante foi relatado por CARMAN (1990) e NORMANLY (1997). O período de tempo de exposição das células cultivadas em meio de cultura suplementado com 2,4-D que vai determinar a competência embriogenética. Se o período de tempo for muito longo, as células perdem a competência, sendo denominadas de células não embriogênicas. A competência embriogênica é expressa temporariamente e é influenciada por reguladores de crescimento endógenos. Segundo NORMANLY (1997), acredita-se que o metabolismo endógeno do ácido indol-3-acético (AIA) também exerce influência no estabelecimento da competência embriogênica. Para as células adquirirem a competência são necessárias concentrações elevadas de AIA endógeno e um decréscimo nos níveis de AIA para o desenvolvimento dos embriões somáticos. No presente trabalho, avaliou-se o tempo de permanência no meio de cultura para expressão dos embriões somáticos, no entanto, são necessários estudos adicionais com tratamentos pulsos com 2,4-D para avaliar o tempo de aquisição da competência embriogenética. Segundo VASIL (1982), a competência embriogenética é aparentemente adquirida durante o período inicial em cultura, na presença de níveis elevados de auxinas. Contudo, embriões somáticos são formados somente se os níveis de 2,4-D estiverem abaixo de determinada concentração. Isto pode ser obtido por meio de repicagens para meios de cultura com baixos valores deste fitorregulador, ou por manutenção durante longos períodos em cultura. A sua presença por longos períodos parece ser antagônica ao desenvolvimento organizado e estas observações podem ser consideradas como uma norma geral do efeito do 2,4-D sobre a embriogênese somática. No presente estudo, a expressão da embriogênese somática de peroba-rosa, foi observada após longo período de permanência em meio de cultura de indução, acrescido de 2,4-D (12 semanas) e, provavelmente ocorreu quando os níveis desse fitorregulador estavam baixos, possibilitando o

desenvolvimento de embriões somáticos globulares até cordiformes. Resultados semelhantes foram obtidos para *Eucalyptus citriodora* e *Daucus carota* nas quais ocorreu o desenvolvimento de pró-embriões após a transferência para meio de cultura sem auxina ou com sua concentração reduzida. Em alguns sistemas, os efeitos das auxinas podem persistir por algum tempo, depois da retirada da auxina exógena do meio de cultura (PARROT *et al.*, 1991).

A iniciação de embriões somáticos de *A. polyneuron* ocorreu principalmente a partir dos tecidos do nó cotiledonar e em menor frequência a partir da lâmina cotiledonar, tanto para o padrão direto, como também indireto (FIGURAS 21D-21G). GUERRA e HANDRO (1998) constataram que a iniciação embriogenética de *Euterpe edulis* sempre ocorria, a partir de tecidos do nó cotiledonar. Considerações feitas por EMONS (1994) e DE KLERK *et al.* (1997) revelaram que somente um número limitado de células competentes num determinado explante respondem se tornando embriogênicas, especialmente durante as primeiras fases da regeneração. As células competentes expressam as características embriogênicas dependendo do ambiente de cultivo, do balanço de reguladores de crescimento, das condições osmóticas, dos aminoácidos e das formulações salinas. O fato de nem todas as células serem competentes para responder a sinais morfogenéticos foi explicado por THORPE (1994), como sendo um bloqueio de regeneração que pode ter uma causa genética, epigenética ou fisiológica. O bloqueio genético pode ser ocasionado pela falta de totipotência. As células vegetais maduras apresentam alterações a nível nuclear, tanto *in vivo*, como *in vitro*, tais como: poliploidia, síntese de DNA diferencial (replicação e amplificação de genes), variação somaclonal (proveniente de mutações, rearranjos estruturais cromossômicos e amplificações de genes). As células cultivadas podem apresentar um genoma idêntico ao da célula-ovo fecundada, no entanto, pode faltar uma determinada característica genética que induziria uma resposta de regeneração *in vitro*. O bloqueio de regeneração também pode ser epigenético caracterizado pela inibição de genes necessários para o crescimento e desenvolvimento organizado. O bloqueio pode ser fisiológico, no sentido de faltarem sinais ambientais para a regeneração. Esses fatores podem ser a ausência de um determinado fitorregulador, numa concentração específica, presença de inibidores no meio de cultura ou no próprio tecido ou condições físicas de cultivo inadequadas.

As respostas morfogenéticas dos embriões somáticos de *A. polyneuron* dependeram de uma interação entre o estado fisiológico do explante, a formulação salina e os fitorreguladores adicionados nos meios de cultura. Para que seja induzida a formação de massas celulares

embriogenéticas, bem como, a expressão de embriões somáticos é necessária a inoculação dos embriões em meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5 ou 10 μM), combinados com 0,5 μM de Cin, BAP ou TDZ. Os explantes inoculados em meios basais, suplementados com 2,4-D, na ausência de uma substância com atividade citocinínica não apresentaram respostas embriogenéticas. Como foi relatado por GEORGE (1996), a adição de uma concentração reduzida de citocinina (0,1-1,0 μM de BAP ou Cin) em meios de cultura suplementados com auxinas aumentou a taxa de crescimento dos calos embriogênicos de muitas espécies de dicotiledôneas.

Os embriões de peroba-rosa inoculados em meios de cultura suplementados com 5 μM de 2,4-D e 0,5 μM de TDZ induziram a formação de embriões somáticos e massas celulares embriogenéticas, independente da formulação salina testada e do estado fisiológico do embrião inoculado. Existem poucos relatos do uso do TDZ para embriogênese somática, no entanto, quando testado, as concentrações variaram entre de 0,5-10 μM , como por exemplo em cotilédones de *Fraxinus americana* (BATES *et al.*, 1992), *Vitis vinifera* (MATSUTA e HIRABAYASHI, 1989), *Arachis hypogaea* (MURTHY *et al.*, 1995). MERKLE *et al.* (1987) e NEUMAN *et al.* (1993) obtiveram os melhores resultados na formação de embriões somáticos de *Juglans nigra* com a utilização da formulação salina WPM, adicionada de um balanço de 2,4-D e TDZ. NEUMAN *et al.* (1993) constataram que com a combinação de 4,5 μM de 2,4-D e 5,0 μM de TDZ ocorreu a expressão de embriões somáticos nos tecidos mais maduros de *Juglans nigra*. Segundo MURTHY *et al.* (1995), o efeito do TDZ na indução da embriogênese somática é de influenciar os níveis endógenos de auxinas e citocininas.

Para que ocorram respostas morfogenéticas é necessário que as células sejam competentes para responder às substâncias químicas reguladoras de crescimento. Os prováveis fatores internos que controlam a competência são os níveis endógenos de fitorreguladores do explante no início do cultivo e a capacidade das células de sintetizar essas substâncias de crescimento ou metabólitos essenciais, como foi citado por GEORGE (1993). Atualmente, ainda não existe um conhecimento completo de como os fitohormônios exercem o seu papel regulador nas plantas (LIBBENGA e MENNES, 1995). Os fitohormônios são facilmente transportados para células responsivas onde estão diretamente envolvidos com o controle da atividade gênica a nível de transcrição ou de tradução em muitos processos fisiológicos. Estas células responsivas são caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao fitohormônio e posteriormente iniciam a resposta na célula. Os receptores estão

localizados nas membranas, no citoplasma e no núcleo e são, na maioria dos casos, de origem proteica (VAN DER LINDE, 1990).

Tem sido proposto que a concentração de uma substância específica, presente num compartimento celular que contém receptores para aquela substância, determina a magnitude de alguns processos reguladores naquela célula. Aceita-se também que os fitohormônios não influenciam as respostas da planta exclusivamente por meio de mudanças na sua concentração, mas que esta regulação também pode ser exercida por mudanças na sensibilidade das células responsivas. Desta maneira, a resposta a um determinado fitohormônio pode ser alterada por mudanças: no número e na afinidade dos receptores e no nível de outras substâncias (FIRN, 1986). Estes aspectos analisados em conjunto explicam porque determinados explantes são responsivos à embriogênese somática e outros não e porque explantes de mesma origem, coletados em diferentes períodos apresentam indução embriogenética. Traduzida desta maneira, a tão conhecida quanto vaga terminologia estado fisiológico do explante seria aquela condição na qual as células responsivas do explante conteriam um grande número de receptores para aqueles reguladores de crescimento presentes no meio de cultura (GUERRA *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação das auxinas sobre processos fisiológicos, proposto por VAN DER LINDE (1990), relaciona-se com a formação de um complexo receptor proteico-regulador de crescimento no citoplasma. Este complexo migra até o núcleo da célula onde promove a ativação da RNA-polimerase, a qual aumenta a transcrição de genes envolvidos na regulação da divisão celular. O receptor é inativado por fosfatase no núcleo, liberando o grupo fosfato e a auxina e subsequente é reciclado no citoplasma em uma conformação inativa. No citoplasma este receptor pode ser novamente ativado se a concentração de cálcio livre for suficientemente alta para ativar a respectiva proteína kinase e se houver auxinas em concentração suficientemente alta para saturar o receptor. Com base nisto, uma hipótese a ser formulada é a de que modelos diretos de embriogênese seriam o resultado de uma ativação de células responsivas contendo receptores para determinado regulador de crescimento. Essas células seriam rediferenciadas para novas rotas morfogénicas gerando células-mães embrionárias competentes, que podem originar populações clonais de células embriogenéticas. Modelos indiretos de embriogênese somática seriam produto de uma desdiferenciação de células contendo estes receptores, gerando células calosas. Células responsivas destes calos podem, por processo de indução, adquirir competência embrionária, gerando populações clonais de células embriogenéticas (GUERRA *et al.*, 1999).

DE KLERK *et al.* (1997) relacionaram alguns fatores importantes que devem ser considerados quando avalia-se a composição hormonal do meio nutritivo: 1- o efeito dos hormônios no meio de cultura pode ser modificado por nutrientes inorgânicos; 2- a absorção diferenciada dos hormônios pelos explantes; 3- pelo fato dos hormônios serem intensamente metabolizados, deve ser considerada a concentração atual dos hormônios nos tecidos; 4- os hormônios aplicados podem alterar o metabolismo de hormônios endógenos.

Segundo DE JONG *et al.* (1993), os reguladores de crescimento empregados induzem a formação de células embriogênicas pela alteração da polaridade celular e promoção de divisões assimétricas subseqüentes. O primeiro sinal de indução de células embriogênicas é uma mudança do modelo de divisão anticlinal para divisões irregulares, periclinais e oblíquas na epiderme (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1985). Acredita-se que os reguladores de crescimento exógenos modificam a polaridade celular pela interferência de gradientes de pH e de campo elétrico estabelecidos ao redor das células (DE JONG *et al.*, 1993). KAWAHARA e KOMAMINE (1995) acrescentaram que a polaridade morfológica é expressa pela primeira divisão celular desigual do embrião em desenvolvimento. Isso é manifestado, inicialmente, pela auxina endógena presente no embrião, pela sua distribuição polar ocasionando a polaridade morfológica. Se auxina for adicionada no meio de cultura, o seu gradiente endógeno adquirido é interrompido pela difusão da auxina exógena do embrião, resultando com isso, na inibição do desenvolvimento embriogenético. Muitos estudos revelaram que o próprio transporte polar da auxina é um pré-requisito para ocorrer morfogênese normal, além do estágio de embrião somático globular (LIU *et al.*, 1993). A dependência da morfogênese no transporte polar da auxina parece ser diferente nos embriões zigóticos e somáticos. Nos embriões somáticos, tratamentos com inibidores do transporte polar da auxina ocasionaram um bloqueio de morfogênese para o próximo estágio da embriogênese somática, enquanto que com os embriões zigóticos ocorreu um efeito menos dramático com os mesmos inibidores do transporte polar da auxina (ZIMMERMAN, 1993).

Uma hipótese para explicar como as auxinas podem influenciar a capacidade das células de originar embriões somáticos foi proposta por OKKELS (1988), o qual sugeriu que a auxina ocasiona hipermetilação do DNA nas células em divisão, que é um pré-requisito para a formação de pró-embriões. Em contraste, o desenvolvimento do embrião necessita da hipometilação do DNA, que ocorre nos pró-embriões quando a auxina é retirada do meio de cultura. O papel das auxinas sintéticas é de interromper as vias de desenvolvimento, possivelmente por hipermetilação de DNA intensificando a produção de células

embriogênicas, a partir de explantes competentes (CARMAN, 1990). A atividade de hipermetilação não é restrita ao 2,4-D, pois quando outras auxinas, como ANA ou AIA foram utilizadas também ocorreu um aumento no nível de metilação (LO SCHIAVO, 1989). Segundo LAMBÉ *et al.* (1997), até 30% dos resíduos de citosina são metilados em 5-metilcitosina. A auxina aumenta a metilação de DNA reversivelmente, enquanto que a Cin tende a bloquear alterações na metilação de DNA (DE KLERK *et al.*, 1997).

LO SCHIAVO *et al.* (1989), citaram que a metilação de DNA é abundante nas plantas, mas o seu papel ainda tem que ser elucidado. Cada tecido tem o seu próprio nível de metilação de DNA que é necessário para manutenção do estado diferenciado e o estado basal é equivalente ao nível de metilação encontrado sem auxina. O nível basal varia entre diferentes tecidos e durante as etapas da embriogênese somática. Os autores acrescentaram que também existe outro tipo de metilação que ocorre, mais ou menos ao acaso, como resposta à auxina. Esse tipo de metilação não é específica para determinado tecido e pode ser perdida na ausência do seu hormônio responsável. Essa metilação ocorre concomitante com o sinal de divisão e desorganiza os modelos diferenciados. Nesse sentido entende-se porque a auxina é sempre necessária para os fenômenos que envolvem uma reprogramação, tal como: aquisição de potencial embriogênético, resposta ao ferimento, formação de tumores ou indução de raízes adventícias.

5.2.3 Indução, multiplicação e manutenção de linhagens celulares embriogênicas

Embriões maduros de peroba-rosa inoculados em meio de cultura LPm, suplementado com 4,5µM de 2,4-D e 0,45 µM de TDZ ou Cin formaram massas celulares friáveis, de coloração branca, translúcida, com a superfície granulosa, que após subcultivos sucessivos em meios de cultura suplementados com concentrações reduzidas de fitorreguladores (2,25µM de 2,4-D e 0,5µM de Cin) estabeleceram linhagens celulares embriogênicas, com elevada taxa de proliferação celular. Das combinações de fitorreguladores testadas, constatou-se que 0,5µM de 2,4-D ou ANA, combinadas com 0,5µM de Cin foram eficientes para a manutenção e crescimento das linhagens celulares, permitindo o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular por muitos subcultivos (15) e por mais de três anos (FIGURA 22A). Observou-se na superfície das massas celulares de peroba-rosa, a formação de embriões somáticos globulares e a manutenção dessas culturas em meio basal, acrescido de 2,4-D, induziu a formação de pró-embriões e embriões somáticos globulares num processo contínuo (FIGURA 22B). A embriogênese somática repetitiva ou secundária também permitiu a

manutenção da capacidade embriogênica por mais de dois anos para muitas outras espécies, tais como: *Eucalyptus citriodora* (MURALIDHARAN *et al.*, 1989), *Juglans nigra* (DENG e CORNU, 1992), *Camellia japonica* (BARCIELA e VIEITEZ, 1993), *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ, 1994) e *Camellia sinensis* (KATO, 1996). Segundo PARROT *et al.* (1991), após a obtenção de células embriogênicas, a presença contínua de auxina pode ser prejudicial para o desenvolvimento normal dos embriões somáticos e se a concentração for suficientemente alta, o embrião poderá originar novos embriões somáticos, em vez de prosseguir para o próximo estágio de sua ontogenia. RAEMAKERS *et al.* (1995) explicaram que o processo de indução dos embriões somáticos primários em secundários está associado com a perda de controle de um grupo integrado de células organizadas dos embriões somáticos. Algumas células são excluídas desse grupo controle e iniciam novos embriões somáticos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Observou-se também que a transferência de algumas massas celulares de peroba-rosa para meio basal LPM, isento de fitorreguladores ou acrescido de 0,1% de carvão ativado permitiu uma contínua proliferação celular (FIGURA 23C). A adição de carvão ativado no meio de cultura pode auxiliar na remoção da auxina dos tecidos (BUCHEIM *et al.*, 1989). O crescimento autônomo das linhagens celulares embriogênicas pode indicar um nível adequado de citocininas ou auxinas ou alterações na sensibilidade desses reguladores de crescimento (DELBREIL *et al.*, 1994). Segundo KRIKORIAN (1995), essa mudança na exigência de auxina de uma determinada cultura é chamada de habituação. Os tecidos que necessitavam de auxina exógena, gradativamente ou repentinamente perderam essa exigência e o mesmo pode ser aplicado para as citocininas. Em muitos casos, mas nem sempre, o processo de habituação é reversível e as células habituadas mantêm a totipotência podendo regenerar raízes, gemas ou embriões somáticos. Entretanto, em outros casos, ocorrem alterações genéticas, como a perda irreversível da totipotência, de modo que a habituação pode ocasionar mutação (LAMBÉ *et al.*, 1997).

O estabelecimento de linhagens celulares embriogênicas por longos períodos (dois a três anos) em meios basais sem fitorreguladores foi relatado para muitas espécies, como *Juglans regia* (TULECKE e McGRANAHAN, 1985), *Daucus carota* (SMITH e KRIKORIAN, 1990), *Asparagus officinallis* (DELBREIL *et al.*, 1994) e *Carya illinoensis* (BURNS e WETZSTEIN, 1997). O principal ponto de controle da manutenção de linhagens em ciclos repetitivos diz respeito à uma considerável redução dos níveis de reguladores de crescimento. Segundo CARMAN (1990), níveis reduzidos de 2,4-D melhoram o

desenvolvimento morfológico e fisiológico dos embriões somáticos. Nos vários sistemas em funcionamento de coníferas, observou-se que as concentrações intermediárias destes reguladores nesta fase, estavam na faixa de 2 a 5 μM para auxinas e para as citocininas (GUPTA *et al.*, 1993). Para a peroba-rosa, concentrações bem inferiores dos fitorreguladores (0,5 μM de 2,4-D ou ANA e 0,5 μM de Cin) foram suficientes para manutenção e proliferação de linhagens celulares. É interessante lembrar que essas concentrações testadas nos embriões maduros de peroba-rosa na etapa de indução da embriogênese somática estimularam a germinação. No entanto, pelo fato das culturas serem mantidas por um período de exposição muito longo (20-24 semanas), em meio de cultura acrescido de 2,4-D e combinado com fitorreguladores com atividade citocinínica, provavelmente o efeito residual desses fitorreguladores permitiu a manutenção das linhagens celulares.

No presente trabalho foi observado que a proliferação das linhagens celulares ocorreu em meios basais, isentos de fitorreguladores, com ou sem carvão ativado (FIGURAS 22C, 23B e 23C), com combinações de concentrações reduzidas de auxinas sintéticas (0,5 μM de 2,4-D ou ANA) e Cin (0,5 μM) (FIGURA 22 A), com combinações de 2-iP e ANA (FIGURAS 22E e 23A), com ABA (FIGURA 23D) e com PEG (FIGURA 23E), sendo subcultivadas a cada oito semanas. Isso indicou que as linhagens celulares mantinham um nível de reguladores endógenos adequado que permitiu a manutenção e proliferação celular. Segundo GEORGE (1993), as células que são determinadas para uma rota específica de desenvolvimento retêm essa capacidade por muitas divisões celulares *in vitro*. Isso pode ser comprovado pela capacidade dos embriões de regenerar embriões somáticos ou massas celulares embriogênicas.

Em alguns casos, quando as culturas de *A. polyneuron* foram mantidas por períodos muito longos no mesmo meio de cultura, superiores a 12 semanas, ocorreu degeneração celular ou após muitos subcultivos (10-12) em meio de cultura de maturação, constatou-se em algumas culturas, uma alteração na textura da massa celular para granulosa fina, caracterizando, provavelmente, a perda da capacidade embriogênica (FIGURA 22D).

Em espécies lenhosas, com um ciclo de vida longo, como da peroba-rosa, as linhagens celulares embriogênicas podem ser mantidas e multiplicadas por longos períodos até que sejam testadas em condições de campo, sendo uma vantagem da embriogênese somática, como foi relatado por RAEMAKERS *et al.* (1995).

5.2.4 Maturação dos embriões somáticos e das linhagens embriogenéticas

As culturas constituídas de embriões somáticos globulares e cordiformes, que foram transferidas para meios de cultura, suplementados com fitorreguladores com atividade citocinínica e ANA, apresentaram diferentes respostas morfogénicas. As combinações de fitorreguladores contendo 12,30 e 24,60 μM de 2-iP, combinadas com 0,5 μM de ANA foram as que apresentaram os melhores resultados, quando comparadas com combinações contendo BAP ou Cin e ANA. Essas combinações de fitorreguladores permitiram a formação contínua de massas celulares friáveis, contendo embriões somáticos em vários estádios ontogénicos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, se desenvolvendo de forma assincrónica (FIGURAS 20E, 22E e 23A). Os embriões somáticos no estágio torpedo foram individualizados e transferidos para meios de cultura de conversão (FIGURA 22F).

Segundo GRAY *et al.* (1995), os embriões somáticos que se formam a partir de complexos pró-embriónicos tendem a se desenvolver de forma assincrónica, sendo que em determinado tempo vários estádios ontogénicos são observados nas culturas. Esses embriões somáticos que são induzidos em tempos diferentes estão sujeitos a alterações nos níveis de nutrientes, quando o meio se torna exaurido, sendo que as condições nutritivas só são restabelecidas após os subcultivos. Com essas condições variáveis e desbalanceadas, os embriões somáticos interrompem a maturação, se tornando desorganizados e formando novas células embriogénicas que contribuem para assincronia. Consequentemente, os embriões somáticos que atingem a maturidade, podem desenvolver órgãos embriónicos em proporções diferentes, ocasionando a germinação precoce, na qual pode se desenvolver somente a parte aérea ou as raízes, não ocorrendo a germinação normal, como também foi observado com a peroba-rosa. Os embriões somáticos também podem apresentar anomalias, como por exemplo, cotilédones adicionais e meristemas apicais pouco desenvolvidos. Esses problemas ocorrem devido as condições de cultivo e não estão relacionados com fatores intrínsecos dos embriões somáticos.

As combinações de fitorreguladores com 2-iP e ANA possibilitaram a proliferação de massas celulares embriogénicas friáveis por muitos subcultivos e isso também foi observado quando as culturas foram transferidas para meios basais, isentos de fitorreguladores ou também com a presença de carvão ativado (0,1%) (FIGURAS 22C e 23C). Resultados semelhantes aos da peroba-rosa foram obtidos quando cachos de embriões somáticos globulares de *Euterpe edulis* foram transferidos para meios de cultura semi-sólidos, contendo 12,30 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA, onde notou-se a progressão para estádios subseqüentes e

a iniciação de embriogênese repetitiva. As culturas embriogênicas de *Euterpe edulis* repicadas para meio de cultura contendo 24,60 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA resultaram na progressão dos embriões somáticos ao mesmo tempo que a cultura matriz mantinha a sua competência embriogênica. Além disto, embriões somáticos em estádios alongados e bipolares freqüentemente originavam novos embriões somáticos globulares de maneira repetitiva e contínua (GUERRA, 1989; GUERRA e HANDRO, 1998). O uso de citocininas também foi importante para o desenvolvimento dos embriões somáticos de *Thevetia peruviana* (Apocynaceae). A freqüência embriogênica foi superior a 80% quando agregados celulares foram inoculados em meios de cultura semi-sólidos, acrescidos de 9,84 μM de 2-iP e 0,45 μM de 2,4-D (SHARMA e KUMAR, 1994). Segundo MERKLE *et al.* (1995), a inclusão de citocininas durante a fase de histodiferenciação pode compensar os efeitos detrimenais induzidos pelas auxinas no desenvolvimento de meristemas. GEORGE (1996) citou que quando as concentrações de BAP e Cin são aumentadas para 5 e 10 μM , elas anulam o efeito da auxina reduzindo a taxa de crescimento dos calos e iniciam a formação de embriões somáticos.

No meio basal, isento de fitorreguladores, observou-se na superfície da massa celular embriogênica friável de peroba-rosa, a formação de embriões somáticos globulares, que por sua vez, formaram em sua superfície embriões somáticos globulares secundários, estabelecendo-se ciclos repetitivos, sendo esse processo conhecido como embriogênese repetitiva (FIGURA 23C). Esse processo de formação de embriões somáticos secundários na superfície de embriões primários, quando cultivados em meios basais, isentos de fitorreguladores, foi denominado de autoembrionia por MERKLE *et al.* (1995). No entanto, a evolução dos embriões somáticos globulares de peroba-rosa em meios basais, isentos de fitorreguladores ocorreu lentamente para estádios ontogenéticos mais avançados e com menor freqüência quando comparados com as massas celulares colocadas em meios de cultura, suplementados com 2-iP e ANA. Resultados semelhantes foram obtidos por LINOSSIER *et al.* (1997), os quais constataram que, em meio basal, isento de fitorreguladores, ocorria uma redução na formação de embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* no estágio torpedo, provavelmente ocasionada por uma falta de reservas de carboidratos e lipídeos que não interrompia a autoembrionia.

Após sucessivos subcultivos (oito, nove) das massas celulares em meios de cultura contendo 2-iP e ANA observou-se uma redução na expressão e desenvolvimento dos embriões somáticos de peroba-rosa, sem que ocorresse uma redução na proliferação celular

das massas celulares embriogénicas. Isso também foi observado por DAL VESCO (1998) em culturas de *Feijoa sellowiana* mantidas em meio de cultura acrescido de 2,4-D, as quais apresentavam proliferação contínua e não maturavam. Este aspecto pode ser atribuído principalmente a presença ou efeito residual de 2,4-D nos meios de cultura, dificultando a progressão do processo de ontogénese dos embriões somáticos, como já foi relatado por ATTREE e FOWKE (1993) e ZIMMERMAN (1993). Segundo LAMBÉ *et al.* (1997), a formação de calos habituais ou calos que não se diferenciam podem ocorrer por hipermetilação de DNA durante a cultura de tecidos. A metilação progressiva de genes envolvidos na diferenciação celular durante a fase de divisão e multiplicação e a eliminação contínua de células capazes de diferenciação são responsáveis pela perda progressiva da totipotência durante a cultura de calo.

O meio de cultura LPM, suplementado com concentrações elevadas de ABA (30-120 μ M) foi eficiente para induzir a maturação de linhagens celulares embriogénicas de peroba-rosa, sendo observada uma alta frequência de embriões somáticos globulares (90) e pró-embriões (FIGURA 23D), além de permitir maior proliferação celular das massas celulares, quando comparado com as culturas colocadas em meios de cultura acrescidos de PEG (FIGURA 23E). Os meios de cultura suplementados com 10mM de PEG também induziram a formação de embriões somáticos globulares e cordiformes na superfície da massa celular embriogénica, entretanto, com menor frequência do que nos meios de cultura acrescidos de ABA. Essa exigência de alta osmolaridade pelos embriões somáticos em cultura está usualmente, relacionada com o observado *in vivo*, onde o fluido do saco embrionário apresenta alto potencial osmótico (RAGHAVAN, 1976).

No presente trabalho, o efeito do ABA e do PEG na maturação das linhagens celulares embriogénicas foi avaliado após muitos subcultivos (12-14), sendo necessários outros experimentos para solucionar o problema da falta de sincronia no desenvolvimento de embriões somáticos. Segundo ZHENG *et al.* (1996), quanto mais cedo o ABA for adicionado no meio de cultura, intensifica o desenvolvimento normal dos embriões somáticos e aumenta a frequência de embriões somáticos produzidos, bem como a sua conversão em plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por LINOSSIER *et al.* (1997), quando avaliaram o efeito da combinação de PEG (140 g.L⁻¹) e ABA (10⁻⁵M) no desenvolvimento de embriões somáticos de *Hevea brasiliensis*. A presença de osmóticos reduziu a embriogénese secundária e melhorou a conversão de massas pró-embriogénicas para embriões somáticos no estágio torpedo e quando o ABA foi testado isolado no meio basal só favoreceu a formação de

embriões somáticos globulares. ASTARITA e GUERRA (1998) também constataram um aumento na formação de pró-embriões de *Araucaria angustifolia* quando o meio de cultura foi suplementado com PEG 8000 (1%) e ABA (7 e 19 μ M). A concentração de 5 ou 10% de PEG 4000, associada com ABA triplicou a frequência de maturação de embriões somáticos de coníferas, além dos embriões somáticos possuírem incrementos nas reservas e na capacidade de sobrevivência aos tratamentos de dessecação (ATTREE e FOWKE, 1993). KONG e YEUNG (1995) também constataram que 40 g. L⁻¹ de PEG foi eficiente para estimular a maturação de embriões somáticos de *Picea glauca*. Os autores citaram que o PEG pode estimular a produção endógena de ABA em espécies de coníferas. As massas celulares de *Hevea brasiliensis* permaneceram em meio de cultura acrescido de 10⁻⁵ M de ABA durante dois meses para o desenvolvimento de embriões somáticos. Após esse período, os embriões somáticos transferidos para meios de cultura suplementados com adeninas ou citocininas se tornavam verdes em um mês (VEISSEIRE *et al.*, 1994).

O emprego do ABA e o aumento da osmolaridade do meio de cultura bloqueiam os ciclos repetitivos de divisão celular impedindo os processos de clivagem poliembriônica (MISRA, 1994; MERKLE *et al.*, 1995) e de gemação em angiospermas (GUERRA *et al.*, 1999). ABA tem sido utilizado para sincronizar fisiologicamente a embriogênese somática. Esse fitorregulador pode interferir nas funções dos reguladores de crescimento endógenos ocasionando alterações nas condições que favorecem a embriogênese somática. Além disso, o ABA pode funcionar como um osmoregulador reduzindo o conteúdo hídrico celular e permitindo o desenvolvimento normal dos embriões somáticos (GRAY e PUROHIT, 1991). ABA é um fitorregulador importante para o desenvolvimento de embriões somáticos de coníferas (ATTREE e FOWKE, 1993), sendo que na sua ausência, poucos embriões somáticos de *Picea glauca* foram produzidos (ROBERTS *et al.*, 1990). A principal vantagem do PEG é que seu peso molecular elevado não permite a sua passagem através das membranas celulares vegetais (ATTREE e FOWKE, 1993). O efeito do PEG já foi relatado para outras espécies, geralmente associado com ABA, em concentrações que variaram entre 70 a 100g.L⁻¹ e para *Hevea brasiliensis*, os melhores resultados foram obtidos com 140 e 178 g.L⁻¹. A adição de PEG nos meios de cultura apresentou efeitos metabólicos de estresse hídrico, tais como incrementos na deposição de proteínas de reserva e dos triglicerídeos. No entanto, o seu modo de ação ainda não foi totalmente elucidado (LINOSSIER *et al.*, 1997). Os autores citaram hipóteses para explicar o efeito benéfico do ABA, associado com PEG, na maturação de embriões somáticos de *Hevea brasiliensis*. Primeiramente, essa associação aumentou o

número de embriões somáticos globulares que se desenvolveram para os estádios posteriores. O PEG induziu a síntese endógena de ABA, enquanto que o ABA é essencial para a maturação, aumentando os ácidos graxos ou induzindo a síntese de proteínas específicas e também pode limitar o efeito de estresse do PEG.

A indução e manutenção da competência embriogenética e o processo de desenvolvimento dos embriões somáticos são afetados por muitos fatores, tais como: os níveis endógenos de auxina, ABA e glicoproteínas liberadas pelas células cultivadas (KIYOSUE *et al.*, 1993). Segundo NORMANLY (1997), são necessários níveis elevados de AIA endógeno para o calo adquirir competência embriogenética e tem que ocorrer um decréscimo nesses níveis para a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos.

Nesta etapa de maturação, constatou-se anormalidades na formação de alguns embriões somáticos de peroba-rosa, tais como: fasciação ou cotilédones fusionados, provavelmente decorrentes do tempo de permanência muito longo das culturas em meio de cultura suplementado com 2,4-D (FIGURA 23F) e muitas vezes, observou-se a formação de embriões somáticos globulares sobre esses embriões anormais. Em alguns casos, numa mesma cultura de peroba-rosa observou-se a formação de um cacho de embriões somáticos globulares, alguns cordiformes, calo compacto e embriões somáticos anormais. Alguns pesquisadores atribuíram essas anormalidades dos embriões somáticos ao efeito residual do 2,4-D no estágio de maturação. Segundo KAWAHARA e KOMAMINE (1995), quando os embriões somáticos cordiformes foram mantidos em meio de cultura com 2,4-D ocorreu deformação dos embriões somáticos e as células proliferavam de maneira desorganizada. Por outro lado, MERKLE *et al.* (1995), revelaram que as citocininas adicionadas no meio de cultura podem multiplicar os ápices dos embriões somáticos, resultando em estruturas que são difíceis de caracterizar como embriogenéticas ou organogenéticas baseadas apenas na sua morfologia externa. Para RAEMAKERS *et al.* (1995), o desenvolvimento de embriões somáticos mal formados e/ou a formação de folhas carnosas com caules fasciados é consequência de maturação insuficiente (RAEMAKERS *et al.*, 1995). Esse fenômeno tem sido observado para muitas espécies e é denominado de germinação precoce, que se refere ao embrião em desenvolvimento que tende a desviar dos estádios normais de embriogênese somática e adquirem características de uma plântula mal formada (AMMIRATO, 1987; RAEMAKERS *et al.*, 1995). O comportamento dos embriões somáticos nos primeiros estádios indicou que eles não são fortemente determinados e durante a histodiferenciação, os embriões somáticos são vulneráveis a perturbações fisiológicas e bioquímicas (CARMAN,

1990). Na embriogênese somática pode ocorrer mutagênese e aparecimento de fenótipos anormais. As principais causas foram relacionadas por ZIMMERMAN (1993): 1- a proporção de células que iniciam e completam a embriogênese somática é variável e decresce à medida que aumenta o tempo de permanência em cultura; 2- o tempo prolongado em cultura pode ocasionar mutações (variação somaclonal); 3- fenótipos de plantas com cotilédones múltiplos não são raros em cultura; 4- muitas linhagens celulares embriogênicas têm um período de vida que, geralmente varia de um a dois anos, sendo que após esse período pode ser impossível a formação de algum embrião somático.

5.2.5 Conversão de embriões somáticos em plantas

Não ocorreu progressão dos embriões somáticos de peroba-rosa a partir do estágio cotiledonar, em meio basal LPM, isento ou acrescido de fitorreguladores. Com o decorrer do tempo, observou-se que não ocorria a emissão da radícula e os embriões somáticos necrosavam ou formavam novos embriões somáticos na superfície do hipocótilo e isso foi comprovado pelas avaliações histológicas (FIGURAS 27 A e 27D). As prováveis causas da falta de conversão foram o efeito residual do 2,4-D, ocasionado pelo tempo de permanência muito longo em meio de cultura de indução ou o embrião somático não atingiu maturidade fisiológica e morfológica suficiente para ser convertido em planta, ocasionando a sua necrose. Segundo REDENBAUGH *et al.* (1988), para que ocorra conversão, os embriões somáticos têm que realizar uma série de eventos: germinação (emissão da radícula), crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, produção de, no mínimo, duas folhas verdadeiras, conexão direta da raiz com a parte aérea e produção de uma planta verde com fenótipo normal.

A figura 14 mostra as rotas de indução e desenvolvimento de culturas embriogênicas de peroba-rosa. Uma das dificuldades encontradas para avaliar melhor as necessidades dos embriões somáticos nessa etapa foi a falta de sincronia de um grande número de embriões somáticos no estágio torpeda. Isso poderia ter sido solucionado se fossem testados meios de cultura com alta osmolaridade nos primeiros subcultivos das massas celulares, sendo esses meios basais acrescidos de ABA e/ou PEG, que são necessários para que ocorra maturação e armazenamento de substâncias de reserva, tanto para as linhagens celulares, como também para os embriões somáticos. Segundo NICKLE e YEUNG (1993), o estágio em que os embriões somáticos de *Daucus carota* foram tratados com ABA afetou a taxa de conversão. Embriões somáticos nos estádios globular e torpeda foram mais eficientes para manter uma

reserva citoplasmática na gema apical do que os torpedos tardios, nos quais o ABA apresentou um efeito inibidor de crescimento. O efeito geral do ABA é de reduzir aberrações dos embriões somáticos que podem estar relacionadas com o estabelecimento do meristema apical. O ABA também pode ser um agente indutor da organização meristemática ou pode induzir que as células da gema apical sejam canalizadas para meristemáticas e não para tecidos fundamentais, com vacuolização precoce. Provavelmente, o fracasso dos embriões somáticos de formar meristemas viáveis é ocasionado pelo processo de germinação que ocorre antes do processo de desenvolvimento.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho ocorreram durante a maturação de embriões somáticos de manga. LITZ (1985) observou que apareciam áreas necróticas nos cotilédones e hipocótilos que se espalhavam por todo embrião somático e que podiam ser evitadas pela adição de agentes redutores ou alteração da composição do meio de cultura. Muitas vezes se desenvolveram embriões somáticos secundários na região do hipocótilo e isso foi controlado pela inclusão de baixas concentrações de citocininas no meio de cultura. Durante as fases de germinação e conversão de *Theobroma cacao*, muitas células dos embriões apresentaram degeneração e oxidação ocasionando a morte do embrião somático e nenhuma plântula foi obtida. Para ALEMANN *et al.* (1997), a causa da falta de conversão dos embriões somáticos é a deficiência de substâncias de reservas, quando comparadas com às dos embriões zigóticos. O problema do efeito residual do 2,4-D, impedindo a maturação dos embriões somáticos, também foi citado por PARROT *et al.*, (1991) e o carvão ativado poderia ser adicionado no meio de cultura para remover o excesso de auxina dos tecidos (BUCHEIM *et al.*, 1989). WETZTEIN e BAKER (1993) atribuíram a falta de desenvolvimento de áreas meristemáticas, como responsável pelas baixas taxas de conversão.

Os embriões somáticos são muito plásticos no seu desenvolvimento, podendo aparecer uma grande variedade de formas embrionárias, algumas das quais interferem na sua capacidade em se desenvolver numa planta. Além disso, os embriões somáticos podem apresentar características morfológicas normais e serem anormais em termos de diferenciação de células e tecidos. Acredita-se que esta plasticidade é o resultado de mudanças no tempo e duração dos eventos organizacionais resultantes do ambiente de cultivo (THORPE, 1988). A exigência mais importante para que ocorra a conversão é a obtenção de embriões maduros e totalmente desenvolvidos. Os embriões somáticos devem apresentar a morfologia externa normal e características internas semelhantes às dos embriões zigóticos. Essas características

incluem os compostos de armazenamento, tais como: proteínas, lipídios e carboidratos (GUPTA *et al.*, 1991).

A maturidade e a coloração branca dos embriões somáticos foram condições essenciais para que ocorresse a germinação de embriões somáticos de *Juglans regia* (DENG e CORNU, 1992) e *Hevea brasiliensis* (CAILLOUX *et al.*, 1996). O aspecto translúcido dos embriões somáticos, muitas vezes observado nos embriões somáticos de peroba-rosa, no presente trabalho, pode refletir uma deficiência no conteúdo de amido e/ou proteína (TULECKE e Mc GRANAHAHAN, 1985). Os embriões somáticos de *Prunus avium* eram translúcidos e apresentaram taxas de conversão em plântulas muito baixas (GARIN *et al.*, 1997). O acúmulo de substâncias de reserva é fator essencial da embriogênese zigótica, na qual são fornecidos compostos que serão utilizados posteriormente na germinação do embrião até que esse alcance a autotrofia. FEIRER *et al.* (1989) relataram que a falta de substâncias de reserva, tais como triglicerídeos afeta os estádios finais de desenvolvimento e a conversão dos embriões somáticos em plântulas. Esses produtos de armazenamento são excelentes marcadores para comparar a qualidade e a fidelidade dos embriões somáticos, desde que acúmulo desses produtos é uma etapa importante do desenvolvimento do embrião somático (CAILLOUX *et al.*, 1996).

Apesar de muitos embriões somáticos originarem plantas normais, ainda existe muita variação na forma, tamanho, número de cotilédones, na sincronização e eficiência da maturação e germinação (VASIL, 1994). As principais limitações para a propagação massal e comercial da embriogênese somática de espécies lenhosas são as baixas frequências no início das culturas e a baixa taxa de conversão de plantas, como também foi constatado no presente trabalho. Para muitas espécies, essa etapa tem dificultado o estabelecimento de protocolos que resultassem na formação de plantas, como por exemplo: *Abies nordmanniana* (NORGAARD e KROGSTROP, 1991) e para *Castanea sativa* x *C. crenata*, a germinação dos embriões somáticos também foi incompleta. A percentagem de embriões somáticos de *Ceratonia siliqua* que germinaram em plântulas foi de 12% (CARIMI *et al.*, 1997) e para *Simarouba glauca* apenas 20-25% dos embriões somáticos germinaram (ROUT e DAS, 1994). Resultados semelhantes foram obtidos por FAURE *et al.* (1998), os quais constataram que os embriões somáticos de *Vitis vinifera* apresentaram desenvolvimento normal até o estágio torpedo. Os embriões somáticos germinavam precocemente e a frequência de plântulas viáveis foi muito baixa. WETZSTEIN e BAKER (1993) justificaram que as taxas baixas de conversão de *Arachis hypogaea* estavam relacionadas com as áreas meristemáticas pouco

desenvolvidas. Como pode ser visto, outras espécies, além da peroba-rosa têm apresentado problemas de conversão havendo necessidade de experimentos futuros para elucidar os fatores que controlam a conversão dos embriões somáticos em plântulas.

5.2.6 Avaliações histológicas

Inicialmente foi feita uma caracterização de um dos embriões da semente poliembriônica de peroba-rosa, antes de ser inoculado em meio de cultura. Na figura 24 pode ser observado um embrião em corte longitudinal com o cotilédone bem desenvolvido e o eixo hipocótilo-radícula. A região cotiledonar é circundada por uma camada de células compactas e bem evidentes de protoderme, sendo preenchida por várias camadas de células que constituem o meristema fundamental, com vários feixes vasculares dispersos que representam o procâmbio, com células mais alongadas e bem coradas. No eixo hipocótilo-radícula também observou-se a camada mais superficial de células formada pela protoderme, seguida do meristema fundamental e a região central do procâmbio, constituída de células mais alongadas, com o citoplasma denso (FIGURA 24).

Algumas massas celulares embriogenéticas, contendo embriões somáticos em vários estádios ontogenéticos foram selecionadas para observação de secções histológicas. Essas massas embriogenéticas estavam sendo subcultivadas em meio de cultura de maturação e apresentavam em sua superfície embriões somáticos nos estádios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

Nas figuras 25A-25C pode-se observar a evolução de pró-embriões até o desenvolvimento de um embrião somático globular, onde pode ser observado que ele é constituído de células pequenas (20-30µm), isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo proeminente, com o nucléolo corado de escuro, pequenos vacúolos e as células se encontram em divisão ativa. Na figura 25A observa-se vários planos de divisão celular no processo de formação do embrião somático globular. Essas características confirmaram que ele é formado de células tipicamente embriogenéticas, que está de acordo com as caracterizações feitas para *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988), *Quercus suber* (EL MAÂTAOUI *et al.*, 1990), *Zea mays* (FRANSZ e SCHEL, 1991), *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ, 1994) e muitas outras espécies. Segundo DE JONG *et al.* (1993), o primeiro sinal de indução de células embriogênicas é uma alteração no plano de divisão anticlinal na epiderme para divisões periclinais e oblíquas. O efeito das citocininas adicionadas aos meios de cultura não é só de estimular a mitose, mas também de promover alterações nos planos de divisão.

Na figura 25B observa-se um típico embrião somático globular, circundado pela protoderme. Segundo WEST e HARADA (1993), a primeira indicação da protoderme foi que as divisões celulares ocorreram principalmente por clivagem perpendicular à superfície do embrião somático. O estágio globular da embriogênese somática marca o início da diferenciação estrutural, de modo que a histogênese inicia com a formação da protoderme circundando o embrião somático globular (YEUNG, 1995).

As células embriogenéticas de peroba-rosa estavam dispostas bem agregadas, com poucos espaços intercelulares e não foi observada estrutura semelhante a um suspensor na extremidade basal do embrião somático globular (FIGURAS 25 A-C). Para outras espécies como *Musa* spp. (LEE *et al.*, 1997) e *Borago officinalis* spp (QUINN *et al.*, 1989) também não foi observada a presença de um suspensor ou estrutura semelhante nas secções longitudinais de embriões somáticos globulares. WILLIAMS e MAHESWARAN (1986) citaram que quando os embriões somáticos estão ligados por uma estrutura semelhante a um suspensor é provável que a sua origem seja unicelular. Se essa hipótese estiver correta, como não foi observada essa estrutura nos embriões somáticos de peroba-rosa, poderíamos supor que a sua origem seria multicelular. Estudos de comparação da embriogênese zigótica e somática realizados por DODEMAN *et al.* (1997) revelaram que existem duas diferenças principais entre os dois sistemas de embriogênese zigótica e somática, que são a falta de diferenciação do tecido suspensor e do endosperma, no processo da embriogênese somática.

As estruturas das células sofrem algumas alterações durante a embriogênese somática, tais como: divisões celulares intensas, aumentos nos conteúdos citoplasmáticos com um concomitante decréscimo no compartimento vacuolar que se organiza em numerosos vacúolos menores e o núcleo ocupando o maior volume da célula, com um nucléolo proeminente. Segundo EL MAÂTAOUI *et al.* (1990), essas características foram mais evidentes nos estádios iniciais de formação dos embriões somáticos globulares, como também foi observado para a peroba-rosa no presente trabalho. A embriogênese somática de *Quercus suber* ocorria em determinadas regiões friáveis que se formavam ao acaso na superfície dos calos. Nessas regiões denominadas de complexos celulares pró-embriionários, as células embriogenéticas sofriam uma série de segmentações, se diferenciavam e produziam embriões somáticos.

Nas secções histológicas analisadas não foi possível determinar a origem dos pró-embriões de peroba-rosa, pois seriam necessárias secções histológicas seriadas das seqüências de desenvolvimento das culturas embriogenéticas. Para algumas espécies tem sido citado a origem unicelular, outras multicelular ou ainda ambas origens podem ocorrer na mesma

cultura. Ainda existem muitas divergências sobre esse assunto. FAURE *et al.* (1996) citaram que é muito difícil, se não for impossível, estudar os planos de segmentação e estabelecer a origem e a relação entre as células que constituem os pró-embriões somáticos.

Nas figuras 25A-25F observou-se o desenvolvimento de embriões somáticos, passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Como foi relatado por ZIMMERMAN (1993) e YEUNG (1995), o estágio globular se formou a partir de pequenos agrupamentos celulares. Esse estágio foi seguido por um estágio oblongo, no qual ocorreu sinais de alteração do crescimento isodiamétrico para simetria bilateral, indicando o início do estágio cordiforme. A transição do estágio globular para cordiforme é marcada pela expansão dos cotilédones, que aparecem como pequenas protuberâncias na região periférica terminal do embrião somático, alongamento do hipocótilo e início do desenvolvimento da radícula. O desenvolvimento continua até os estádios de torpedo e plântula. As plântulas podem ser identificadas pela presença de cotilédones verdes, hipocótilo alongado e radícula desenvolvida.

Com o desenvolvimento dos embriões somáticos para os estádios torpedo e cotiledonar, constatou-se que as células se tornaram mais vacuolizadas (FIGURAS 25D e 25F). Esses resultados estão de acordo com os de RODRIGUEZ (1994) e de ALEMANN *et al.* (1996) que constataram que durante a ontogenia dos embriões somáticos, as células não apresentaram características de embriogênicas. CANHOTO e CRUZ (1996) citaram que ainda se conhece muito pouco sobre a ontogenia, os primeiros eventos de diferenciação dos embriões somáticos e a determinação de quais tecidos induzem a embriogênese somática.

A embriogênese somática de peroba-rosa foi caracterizada por uma notável assincronia, sendo que pró-embriões e embriões somáticos em vários estádios ontogenéticos foram observados na mesma massa celular embriogenética. Essa observação também foi feita por EL MAÂTAOUI *et al.* (1990) para *Quercus suber*.

Na secção longitudinal do embrião cotiledonar de peroba-rosa observou-se na extremidade superior o início do desenvolvimento dos cotilédones, a diferenciação dos primeiros elementos traqueais do protoxilema e a formação do eixo hipocótilo-radícula (FIGURAS 26 e 27). Esse eixo apresentou um maior crescimento e desenvolvimento, quando comparado com o eixo do embrião zigótico (FIGURA 24). As células do embrião somático caracterizaram-se por serem mais vacuoladas e somente na extremidade do eixo, onde está ocorrendo a formação da radícula, as células são menores, isodiamétricas, com citoplasma denso. Nas figuras 26 e 27A observou-se a camada mais superficial do embrião somático,

denominada de protoderme, seguida de várias camadas compactas de células que constituíram o meristema fundamental e na região central estava ocorrendo a diferenciação do procâmbio, onde as células são mais alongadas e densamente coradas. As figuras 27B e 27C mostram a diferenciação dos primeiros elementos traqueais do protoxilema, apresentando um espessamento espiralado. FAURE (1989) também constatou que o sistema vascular dos embriões somáticos de *Vitis rupestris* apresentava traqueídes espiralados. Observações semelhantes foram feitas por NICKLE e YEUNG (1993), os quais citaram que o estabelecimento de tecidos bem diferenciados, como o protoxilema, indicou maturidade cronológica dos tecidos de *Daucus carota*, na ausência de meristema apical, demonstrando um atraso na formação do meristema apical.

Análises histológicas revelaram que os embriões somáticos de peroba-rosa não completavam o desenvolvimento por não apresentarem meristema apical ou por esse ser parcialmente organizado e isso foi observado nas figuras 26 e 27. Para que a embriogênese somática seja concluída, os meristemas primários têm que estar formados (DODEMAN *et al.*, 1997). Como também foi observado por RODRIGUEZ (1994), nos embriões cotilédones de *Carya illinoensis* não havia continuidade vascular entre o embrião e o tecido inoculado. QUINN *et al.* (1989), analisando secções histológicas de *Borago officinalis*, consideraram que se tratava de embriões somáticos pela presença do meristema radicial bem definido e pelo desenvolvimento dos cotilédones. No entanto, essas estruturas não foram consideradas bipolares porque não ocorreu a diferenciação do meristema apical. ALEMANN *et al.* (1996) também observaram estruturas embrionárias isoladas de *Theobroma cacao* que apresentavam protoderme, feixes de procâmbio, mas não os meristemas apicais. Posteriormente, essas estruturas não se desenvolviam e as células perdiam as características embrionárias. FAURE (1989) constatou que apenas 27% dos embriões somáticos possuíam meristema radicial e caulinar, cuja organização histológica foi semelhante à dos embriões zigóticos. Os outros embriões somáticos só possuíam meristema radicial.

EMONS (1994) resumiu as etapas mais importantes da embriogênese somática e essas etapas puderam ser visualizadas nas avaliações histológicas da peroba-rosa: 1- o desenvolvimento do embrião somático iniciou com um grupo de células densamente citoplasmáticas que sofreram alteração da divisão celular; 2- por meio de sucessivas divisões e sem que ocorresse alongamento celular, esse grupo de células formou um glóbulo constituído de pequenas células conectadas por plasmodesmas que permitiram a comunicação intercelular e foi circundado por uma protoderme formada de células menores que isolam o

glóbulo das células vizinhas; 3- finalmente houve a necessidade da presença de células meristemáticas para iniciar e controlar o crescimento do embrião, com a formação de meristema da parte aérea e da raiz em lados opostos.

As figuras 28 A e 28B são secções transversais mostrando a presença de nódulos meristemáticos formados por um processo de gemação a partir das camadas epidérmicas e sub-epidérmicas do cotilédone, caracterizando a formação de pró-embriões e embriões somáticos globulares de peroba-rosa. As regiões embriogenéticas são formadas a partir de camadas celulares sub-epidérmicas mitoticamente ativas que sofrem uma rápida divisão e proliferação de células. Isso está de acordo com descrições feitas para outros sistemas de embriogênese somática (BARCIELA e VIEITEZ, 1993; PLATA *et al.*, 1991; RODRIGUEZ, 1994).

Alguns embriões somáticos, em vez de prosseguirem com a maturação, interrompem o desenvolvimento e formavam embriões somáticos secundários. Nas figuras 27A e 27D observou-se a formação de estrutura meristemática no eixo do hipocótilo, provavelmente, o início do desenvolvimento de um embrião somático secundário. ALEMANNO *et al.* (1996) também observaram a formação de embriões secundários de *Theobroma cacao*, os quais ocorriam por um processo de gemação, sem que ocorresse a formação de calos. As células epidérmicas e sub-epidérmicas se multiplicavam formando embriões secundários adventícios. Esse mesmo processo também foi descrito para *Quercus suber* (EL MAÂTAOUI *et al.*, 1990) e para *Camellia reticulata* (PLATA *et al.*, 1991).

Nas secções histológicas também foi possível observar células calosas (FIGURA 28F) que se diferenciavam das embriogenéticas (FIGURA 28E) por serem maiores, apresentarem tamanhos irregulares e serem mais vacuolizadas. Na figura 28F observou-se a presença de uma substância corada de vermelho envolvendo as células do calo. É provável que essa substância seja restos de meio de cultura que permaneceram entre as células desorganizadas do calo. Segundo RODRIGUEZ (1994), a proliferação de calos de *Carya illinoensis* podia ser observada, com frequência, associada com áreas embriogenéticas. Geralmente, as células do calo eram maiores e apresentavam uma disposição não tão compacta. Frequentemente foram observados nas amostras de tecidos, restos de meios de cultura, mucilagens e outros produtos eliminados do crescimento em cultura. Segundo FRANSZ e SCHEL (1991), as células do calo de *Zea mays* excretavam uma substância mucilaginosa que preenchia os grandes espaços formados entre os agregados celulares, facilitando o transporte de nutrientes e metabólitos por difusão.

Nas secções histológicas também foram constatadas anormalidades no desenvolvimento dos embriões somáticos, tais como: embriões com os cotilédones fusionados, fasciações ou até mesmo embriões cotiledonares anormais, com células altamente vacuoladas e de formatos irregulares, com embriões somáticos globulares se desenvolvendo em sua superfície (FIGURAS 28C e 28D). ALEMANNO *et al.* (1996) também observaram que os embriões somáticos de *Theobroma cacao* apresentavam aberrações morfológicas, como por exemplo: cotilédones fusionados e isso foi comprovado pelos estudos histológicos. AMMIRATO (1987) relatou que podem ocorrer muitas formas anormais de embriões somáticos, apesar de ser possível a escolha de indivíduos que apresentem características morfológicas idênticas às dos embriões zigóticos, nos estádios globular, cordiforme e torpedo. As principais causas são: 1- a embriogênese em células cultivadas é altamente repetitiva e os embriões somáticos podem produzir embriões menores ao longo do eixo, às vezes restritos a um determinado local, como por exemplo na junção do hipocótilo-radícula ou na base da radícula. Também podem ocorrer embriões secundários ou acessórios, ao longo de todo eixo embrionário. Essa é uma das principais causas da falta de sincronia nas populações de embriões somáticos; 2-Além de embriões individualizados, também podem ser formados embriões duplos, triplos ou múltiplos agregados; 3- O desenvolvimento do cotilédone pode apresentar variações quanto ao número e morfologia. Pode existir um, dois, três ou mais cotilédones num eixo isolado e esses podem apresentar pouco desenvolvimento ou podem ser parcialmente ou completamente fusionados; 4- Quando os embriões amadurecem, eles podem prosseguir diretamente na formação de plântulas, sem que ocorra a parada de crescimento associada com a maturação da semente. Em muitos casos, isso pode ocorrer prematuramente (germinação precoce), com as mesmas consequências dos embriões zigóticos imaturos quando colocados em cultura, geralmente ocasionando o crescimento de plantas malformadas ou abortadas. Segundo PHILLIPS *et al.* (1990), vários eventos mutacionais estão direta ou indiretamente relacionados com modificações de DNA, especificamente hipo/hipermetilação de DNA.

Pelo fato dos embriões somáticos se desenvolverem por meio de alterações morfológicas semelhantes às associadas com o desenvolvimento dos embriões zigóticos, a embriogênese somática serve como sistema modelo para investigar o início do desenvolvimento das plantas (KIYOSUE *et al.*, 1993).

5.2.6 Avaliações citoquímicas

As massas celulares utilizadas para as análises citoquímicas estavam proliferando em meio de cultura LPM, suplementado com 1,25 μM de 2,4-D e 0,5 μM de Cin (FIGURA 29A) ou 30 μM de ABA (FIGURA 29B). Essas massas celulares caracterizaram-se por serem friáveis, apresentarem coloração branca e textura granulosa. A massa celular proliferando em meio de cultura suplementado com ABA foi selecionada por apresentar muitos embriões somáticos globulares em sua superfície (FIGURA 29B). Essas massas celulares estavam sendo mantidas por aproximadamente três anos, sendo feitos subcultivos sucessivos para meios de cultura de manutenção de linhagens embriogênicas a cada oito semanas. As características estruturais indicaram que as células possuíam características tipicamente embriogênicas, isodiamétricas (20-30 μm), com citoplasma denso, contendo poucos e pequenos vacúolos, núcleo proeminente e alta capacidade de divisão celular (FIGURAS 29F, 30A e 30B). A maior parte das células da massa celular pró-embriogênica se coraram de vermelho devido a forte reação ao carmin acético, indicando com isso que tratavam-se de células embriogênicas (FIGURAS 29D-F e 30A e 30B). Nos estudos citoquímicos, o carmin acético e feulgen são corantes normalmente utilizados para detectar glicoproteínas, cromatina e DNA (GUPTA e DURZAN, 1987). As células que reagem fortemente ao corante carmin acético e fracamente ao azul de Evans são embriogênicas e contêm grandes quantidades de material proteico que são representados pelas nucleoproteínas e células com reação fraca ao primeiro e intermediária ao segundo são calosas (DURZAN, 1988).

Os embriões somáticos globulares que se desenvolviam na superfície da massa celular pró-embriogênica reagiram fortemente ao carmin acético, como pode ser observado nas figuras 29C e muitas células apresentaram-se unidas formando agregados, característicos de embriões somáticos pré-globulares e globulares de forma repetitiva (FIGURAS 29D e 29E), conforme relatado por SMITH e KRIKORIAN (1990) e DAL VESCO (1998). As características de células embriogênicas descritas por SHARMA e KUMAR (1994) para *Thevetia peruviana* foram similares às observadas para a peroba-rosa, neste trabalho. As células embriogênicas caracterizaram-se por formar grupos de pequenas células arredondadas, densamente citoplasmáticas, contendo grãos de amido e com forte afinidade por carmin acético.

As análises citoquímicas realizadas com lugol evidenciaram a presença de numerosos grãos de amido dispersos na célula que apresentaram-se corados de preto-azulado (FIGURAS 30C-E). Como pode ser observado na figura 30C, as extremidades dos agregados celulares

apresentavam grandes acúmulos de grãos de amido e na figura 30D constatou-se a presença de 15 a 18 grãos de amido por célula, sendo que essa quantidade está de acordo com a caracterização de célula embriogênica feita para *Daucus carota*. Segundo EMONS (1994), as células embriogênicas de cenoura apresentavam de 5-25 grãos de amido por célula, enquanto que as não embriogênicas possuíam de um a dois grãos de amido por célula. BARCIELA e VIEITEZ (1993) também evidenciaram acúmulo de pequenos grãos de amido nas camadas superficiais dos embriões somáticos globulares e nas células pró-embriogênicas e embriogênicas de *Camellia japonica*. Para outras espécies, como: *Quercus suber* (EL MAÂTAOUI, 1990) e *Vitis rupestris* (FAURE, 1989) também foi constatado a presença de grãos de amido nas células embriogênicas e nos embriões somáticos. RODRIGUEZ (1994) também observou que a formação de protuberâncias embriogênicas foi precedida de um grande acúmulo de grãos de amido nas camadas sub-epidérmicas mais superficiais do explante. O amido foi utilizado rapidamente durante a formação de regiões embriogênicas, ficando ausente nos embriões somáticos nos estádios globulares e cordiformes.

A presença de amido em células potencialmente morfogenéticas tem levado alguns pesquisadores a considerá-lo como um marcador embriogênético ou morfogenético (PROFUMO *et al.*, 1987; SCHWENDIMAN *et al.*, 1988; PLATA *et al.*, 1991; RODRIGUEZ, 1994). Segundo STAMP (1987) e PLATA *et al.* (1991), o amido é metabolizado rapidamente em tecidos embriogênicos, fornecendo energia para a intensa atividade mitótica e metabólica.

Poucos estudos têm utilizado acúmulo de amido para avaliar o desenvolvimento de um embrião somático. Nestes estudos, constatou-se um aumento no conteúdo de amido durante a maturação dos embriões somáticos, os quais continham níveis significativamente mais altos do que os embriões zigóticos. Esses resultados indicam que os embriões somáticos são metabolicamente diferentes dos embriões zigóticos e incapazes de converter carboidratos em lipídeos e proteínas de reserva. As condições de maturação, tais como: concentrações de sacarose, reguladores de crescimento exógenos, osmóticos e outros fatores influenciam os níveis de amido (MERKLE *et al.*, 1995).

As figuras 30F-H mostram agregados celulares contendo corpúsculos lipídicos, corados de alaranjado com sudam III. A quantidade de corpúsculos lipídicos por célula foi menor do que a de grãos de amido. Muitas pesquisas têm utilizado substâncias de reserva como marcadores para avaliar a qualidade do desenvolvimento do embrião somático, principalmente se concentrando no acúmulo de proteínas e lipídeos (MERKLE *et al.*, 1995).

O armazenamento de lipídeos também pode ser considerado um indicador de que o tecido cultivado *in vitro* irá formar embriões somáticos. Os lipídeos de armazenamento observados nos embriões somáticos de *Elaeis guineensis*, inicialmente apresentavam a forma de pequenas gotículas que se combinavam para formar uma ou duas gotas maiores em cada célula, como também foi observado nos agregados celulares de peroba-rosa. Essas gotas lipídicas foram observadas no início da formação dos embriões somáticos de *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988). Ao contrário, MERKLE *et al.* (1995), relataram que o armazenamento de lipídeos ocorria principalmente durante a fase de maturação do embrião, que, muitas vezes, coincide com a deposição de proteínas de armazenamento. Os autores acrescentaram que podem ocorrer diferenças nas composições de lipídeos e ácidos graxos dos embriões zigóticos e somáticos que, provavelmente, refletem o tipo de protocolo de maturação utilizado. Em embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* também foi observado um acúmulo de lipídeos em diferentes estádios de desenvolvimento (CAILLOUX *et al.*, 1996) e em *Borago officinalis* foram observados lipídeos de armazenamento nos embriões somáticos no estágio cotiledonar (QUINN *et al.*, 1989).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram relatados por CHOI e SOH (1997), os quais observaram que a maioria das células embriogênicas de *Apium graveolens* L. mediam 25 µm, apresentavam citoplasma denso, contendo grãos de amido abundantes, com exceção de algumas células isoladas possuíam grandes vacúolos e mediam entre 30 e 60 µm. Algumas células isoladas, vacuolizadas e de tamanho maior do que as células embriogênicas também foram observadas nas culturas celulares de peroba-rosa. Segundo HALPERIN (1995), as culturas em suspensão e os calos apresentam células isoladas de vários tamanhos e potencialidades de desenvolvimento. Algumas células grandes e altamente vacuoladas encontradas, raramente se dividiam, no entanto, elas podem ser induzidas a se dividir e produzir agrupamentos que, posteriormente, podem formar embriões somáticos. As linhagens celulares de *Feijoa sellowiana* descritas por DAL VESCO (1998) apresentaram características muito semelhantes às obtidas para a peroba-rosa. As células embriogênicas apresentaram tamanho pequeno (20-30 µm), formato isodiamétrico, com citoplasma denso e com grande número de organelas. O núcleo grande, caracterizado pela forte reação ao carmin acético e indicando grandes quantidades de material proteico que, segundo DURZAN (1988) são representados pelas nucleoproteínas, demonstrando alta capacidade de divisão celular. As células embriogênicas também apresentaram acúmulo de grãos de amido e corpos lipídicos.

Ao contrário do que foi relatado por muitos pesquisadores, ZAKI e DICKSON (1990) e TELMER *et al.* (1993) citaram que o acúmulo de amido e/ou lipídeos só acompanha o desenvolvimento não embriogênico. Para considerar o acúmulo de lipídeos e de grãos de amido como indicadores embriogênicos de peroba-rosa são necessários estudos adicionais que permitam a caracterização desde o início do estabelecimento das linhagens celulares até a formação dos embriões somáticos.

6 SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- 1- O tratamento com solução de hipoclorito de sódio a 0,25% durante 10 minutos foi satisfatório (70% de sobrevivência) para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, independente da época do ano (verão e outono).
- 2- O bicloreto de mercúrio foi mais eficiente que o hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, sendo recomendado o tratamento de 0,05% de HgCl_2 , durante 10 minutos. Em todas as estações do ano foram estabelecidas culturas assépticas, no entanto, os melhores resultados foram obtidos na primavera e verão .
- 3- O meio de cultura WPM foi apropriado para o estabelecimento das culturas *in vitro*, indução de brotações múltiplas e desenvolvimento de raízes.
- 4- Brotações apicais de mudas de dois anos de idade apresentaram as maiores taxas médias de regeneração de brotações axilares em meio de cultura WPM, suplementado com 4,4 μM a 8,8 μM de BAP ou ZEA, após o segundo subcultivo.
- 5- A indução de brotações mais alongadas ocorreu em meio de cultura acrescido de 2,25 μM de BAP ou ZEA e 1,25 μM de AIB, facilitando com isso a transferência das brotações para a etapa de enraizamento.
- 6- Explantes provenientes do hipocótilo de sementes germinadas *in vitro* induziram as maiores taxas médias de regeneração de brotações e de enraizamento, quando comparados com os oriundos do epicótilo.
- 7- Explantes do hipocótilo e epicótilo induziram os maiores números médios de brotações (7 a 8), no terceiro subcultivo, em meio de cultura WPM, suplementado com 10 μM de BAP. A adição de 0,5 μM de AIB ou ANA não interferiu significativamente nas taxas médias de regeneração das brotações.
- 8- A indução de raízes ocorreu com tratamentos pulsos com solução de 10 mM de AIB durante 15 minutos, tanto para as brotações originadas de mudas crescendo em casa de vegetação, como também para as retiradas de sementes germinadas *in vitro*.
- 9- As mudas de peroba-rosa apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 90% em casa de vegetação climatizada.
- 10- A expressão de rota de embriogênese somática de peroba-rosa ocorreu em baixa frequência e de forma assincrônica nas culturas primárias.
- 11- Foram observados os padrões de embriogênese somática direto e indireto, a partir de embriões imaturos, e indireto, a partir de embriões maduros.

- 12- A indução de embriões somáticos ocorreu nos meios de cultura LPm, WPM e MS, no entanto, com maior frequência no meio LPm.
- 13- A indução de massas celulares embriogenéticas e de embriões somáticos ocorreram quando embriões foram inoculados em meios de cultura, acrescidos de 2,4-D (5 ou 10 μ M), combinados com 0,5 μ M de Cin, BAP ou TDZ.
- 14- A combinação de 5,0 μ M de 2,4-D e 0,5 μ M de TDZ foi eficiente na indução de embriões somáticos e massas celulares embriogenéticas de peroba-rosa, independente da formulação salina testada e do estado fisiológico do embrião inoculado.
- 15- Linhagens celulares embriogenéticas foram estabelecidas e mantidas em proliferação contínua por mais de três anos em meio de cultura LPm, suplementado com 0,5 μ M de 2,4-D ou ANA e 0,5 μ M de Cin. Embriogênese repetitiva também ocorreu em meio basal LPm, isento de fitorreguladores.
- 16- A maturação de embriões somáticos ocorreu de forma assincrônica em meio de cultura LPm., contendo 12,30 ou 24,60 μ M de 2-iP e 0,5 μ M de ANA. Não ocorreu conversão dos embriões somáticos.
- 17- O meio de cultura LPm, suplementado com 30 μ M de ABA induziu a maturação de linhagens celulares embriogenéticas, de alta frequência de pró-embriões e embriões somáticos globulares.
- 18- Avaliações histológicas confirmaram a rota de embriogênese somática de peroba-rosa e permitiram caracterizar células embriogenéticas e embriões somáticos em vários estádios ontogenéticos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.
- 19- Avaliações citoquímicas permitiram a caracterização de células embriogenéticas e evidenciaram a presença de corpúsculos lipídicos e grãos de amido.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuíram para o conhecimento dos principais fatores que controlam a morfogênese *in vitro* de *A. polyneuron* e permitiram o estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* desta espécie.

A propagação clonal *in vitro* foi obtida pela rota organogenética, a partir de explantes juvenis: brotações apicais de mudas de dois anos e explantes do epicótilo e hipocótilo de sementes germinadas *in vitro*. Tratamentos de desinfestação com NaOCl e HgCl₂ foram eficientes e permitiram o estabelecimento de culturas assépticas, independente da estação do ano. A indução de brotações múltiplas ocorreu em meio de cultura WPM, acrescido de 5-10 μM de BAP e de brotações alongadas com 2,25 μM de BAP e 1,25 μM de AIB. A indução de raízes foi eficiente com tratamentos pulsos com solução de AIB (10 mM-15 minutos) e as mudas transplantadas e aclimatizadas apresentaram elevadas taxas de sobrevivência em casa-de-vegetação.

A indução e expressão da rota embriogenética foi de baixa frequência e de forma assincrônica nas culturas primárias, no entanto, a embriogênese somática repetitiva permitiu o estabelecimento de linhagens celulares embriogenéticas, com alta proliferação celular, que estão sendo mantidas em cultura por mais de três anos. As respostas morfogenéticas de peroba-rosa mostraram uma dependência da interação entre o estado fisiológico dos explantes, da formulação salina e dos fitorreguladores adicionados nos meios de cultura. A indução de embriões somáticos ocorreu a partir de embriões maduros e imaturos, inoculados em meios de cultura, acrescidos de 2,4-D (5 ou 10 μM), combinados com 0,5 μM de Cin, BAP ou TDZ. Linhagens celulares embriogenéticas foram estabelecidas e mantidas em proliferação contínua em meio de cultura LPm, suplementado com 0,5 μM de 2,4-D ou ANA e 0,5 μM Cin. A maturação dos embriões somáticos ocorreu de forma assincrônica em meio de cultura contendo 12,30 ou 24,60 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA. Os embriões somáticos apresentaram a mesma seqüência ontogenética dos embriões zigóticos até o estágio torpeda. No entanto, não foi possível controlar os fatores que levam à conversão em plântulas. Foram identificados alguns fatores determinantes da competência e determinação celular para indução e desenvolvimento de embriões somáticos e de linhagens celulares embriogenéticas. As avaliações citoquímicas e histológicas permitiram a caracterização de células embriogenéticas e de embriões somáticos em vários estádios ontogenéticos, confirmando a rota embriogenética desta espécie.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram a necessidade de experimentos futuros visando otimizar os processos de organogênese e embriogênese somática de *A. polyneuron*:

- 1- Realização de estudos comparativos da origem das brotações regeneradas: axilares e adventícias nas etapas de indução de brotações múltiplas, de enraizamento e avaliação do seu comportamento nas mudas regeneradas *in vitro*.
- 2- Avaliação de segmentos nodais de explantes juvenis na indução de brotações múltiplas.
- 3- Estudos de genética molecular para identificar a origem dos embriões da semente poliembriônica e de embriões somáticos de peroba-rosa.
- 4- Avaliação dos efeitos de tratamentos pulsos e da presença contínua dos embriões inoculados em meios de cultura suplementados com fitorreguladores.
- 5- Avaliação de outras fontes de explantes para a indução da embriogênese somática.
- 6- Avaliação dos efeitos de fontes de nitrogênio, isoladas e/ou combinadas, nas etapas da embriogênese somática.
- 7- Avaliação do efeito de osmóticos, ABA e/ou PEG e aminoácidos visando aumentar a maturação de linhagens celulares embriogenéticas e de embriões somáticos de forma sincronizada.
- 8- Estudos dos principais fatores que interferem na maturação e conversão dos embriões somáticos, visando futuramente a produção de sementes sintéticas com altas taxas de regeneração em plantas completas.
- 9- Aprofundamento de estudos histológicos e citoquímicos em todas as etapas da embriogênese somática.
- 10- Avaliação da fidelidade clonal das plantas regeneradas via organogênese e embriogênese somática por meio de marcadores moleculares.

FIGURAS

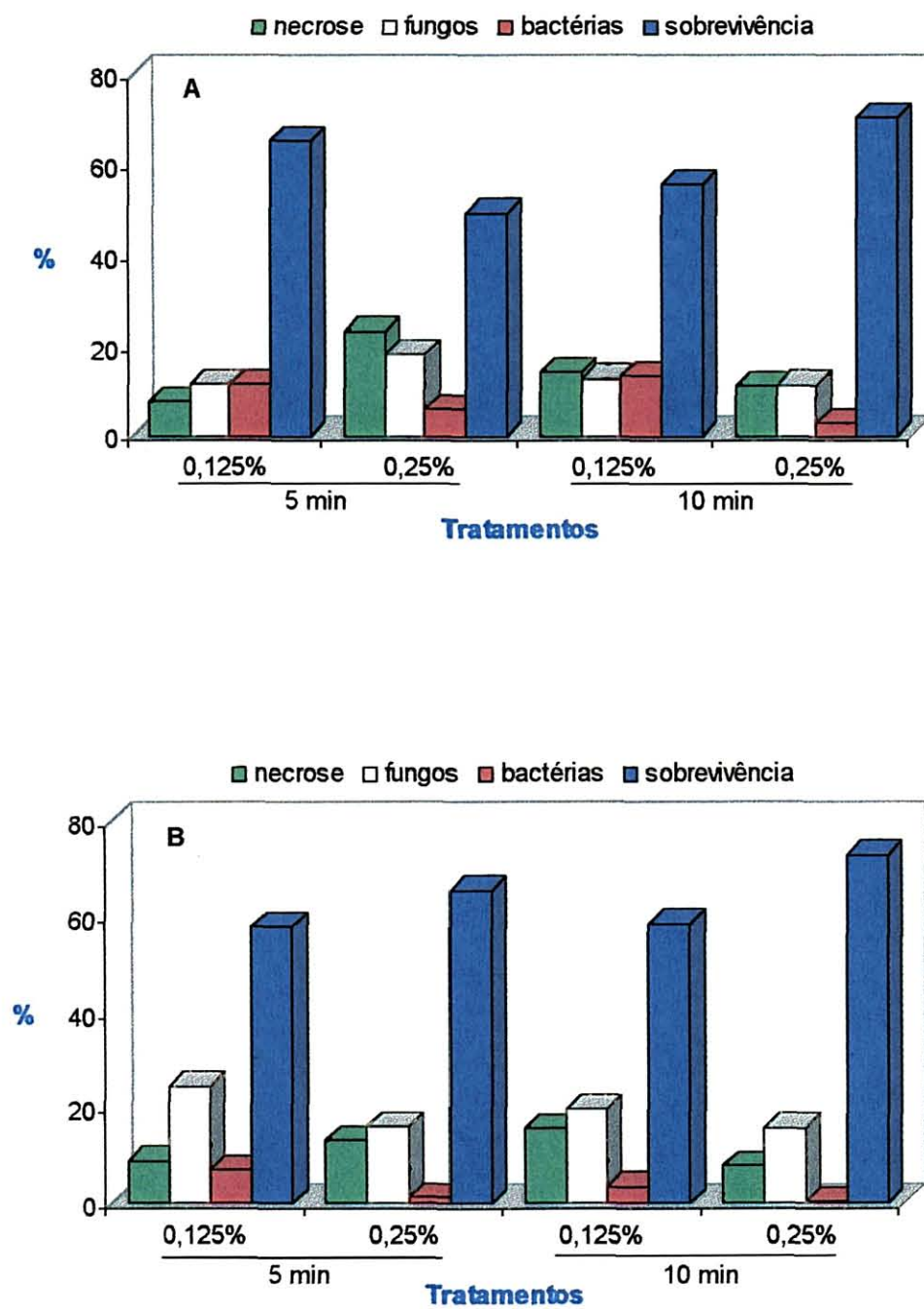


FIGURA 1. COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM NaOCl EM BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* REALIZADOS NO VERÃO (A) E OUTONO (B) DE 1992.

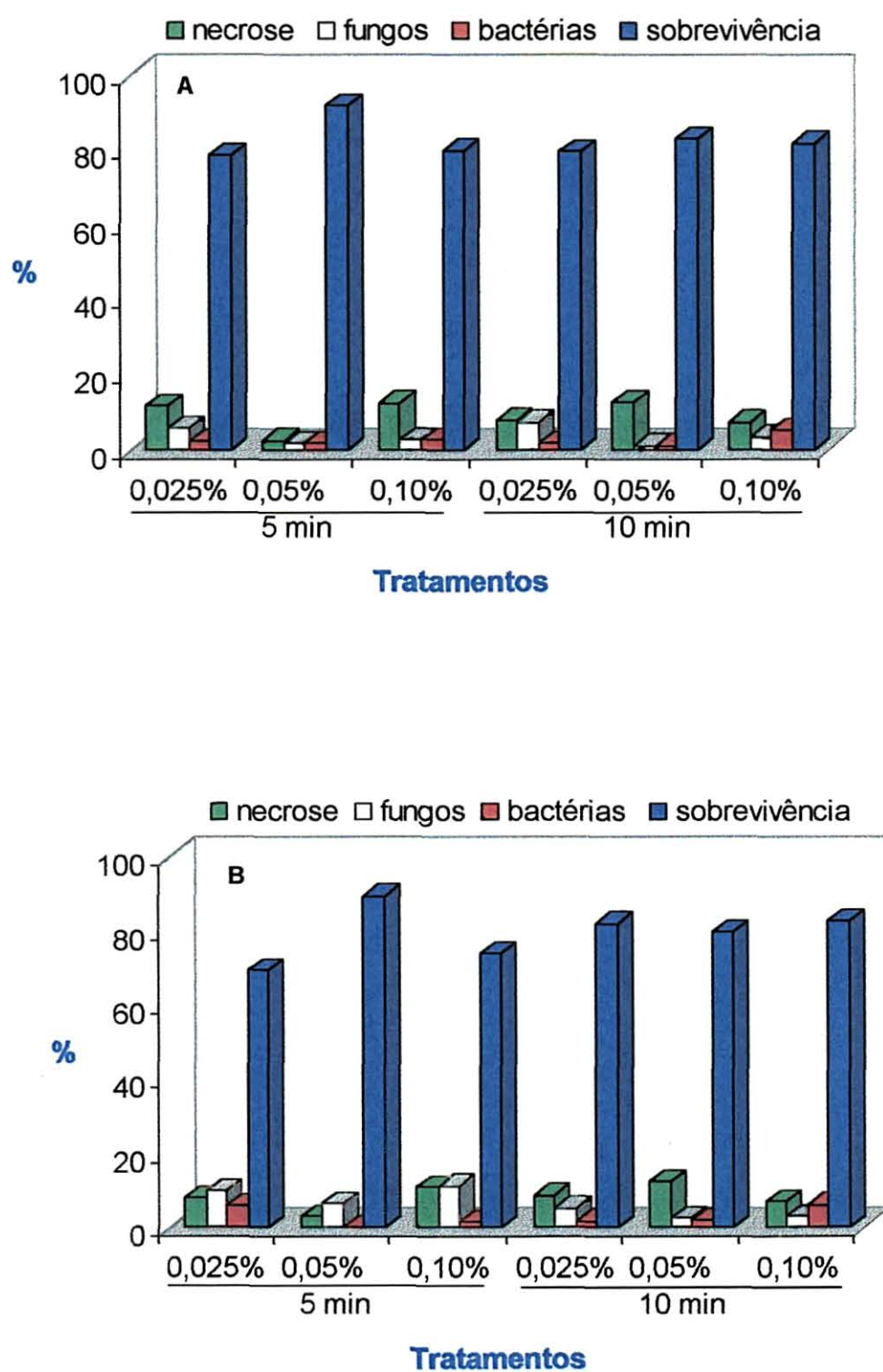


FIGURA 2. COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM $HgCl_2$ EM BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* REALIZADOS NO INVERNO (A) E PRIMAVERA (B) DE 1992.

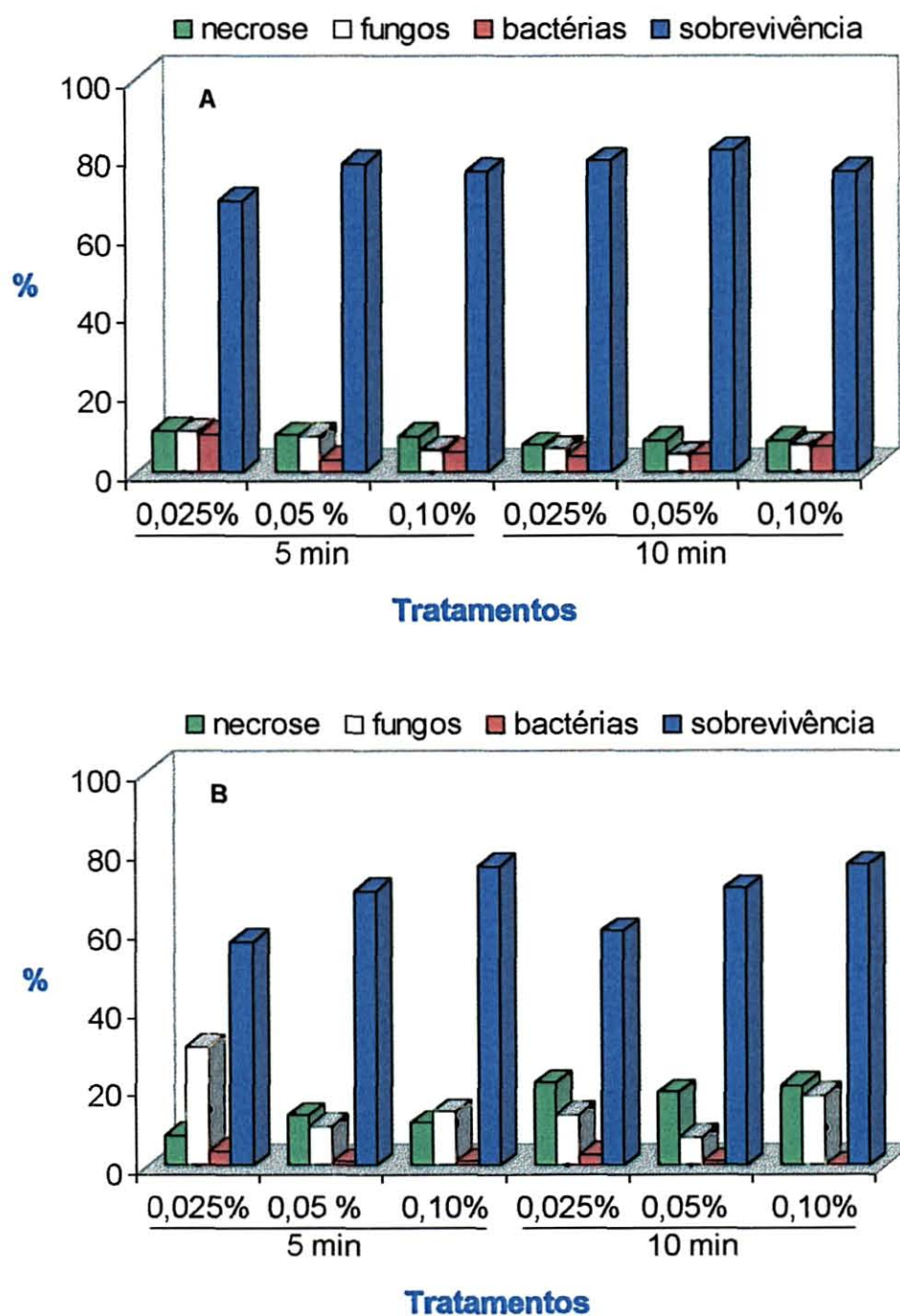


FIGURA 3. COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM $HgCl_2$ EM BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* REALIZADOS NO VERÃO (A) E OUTONO (B) DE 1993.

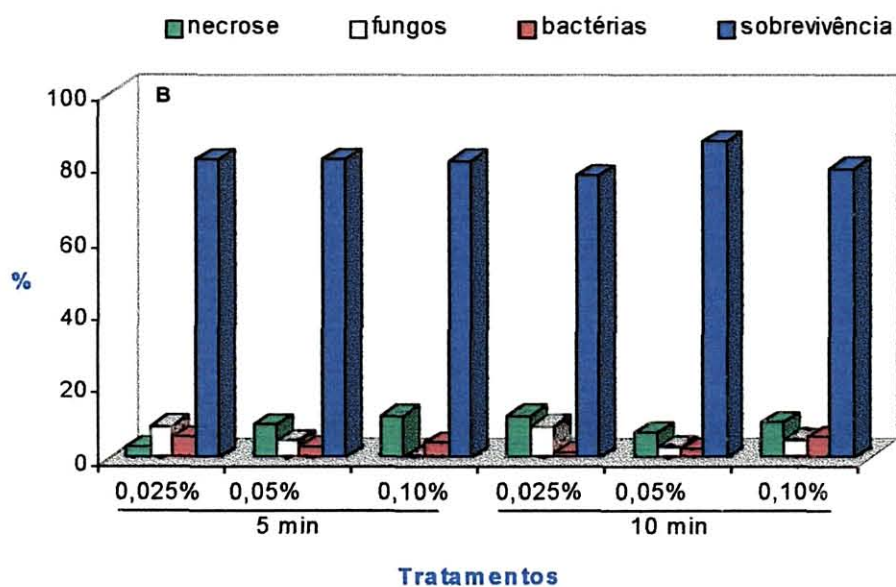
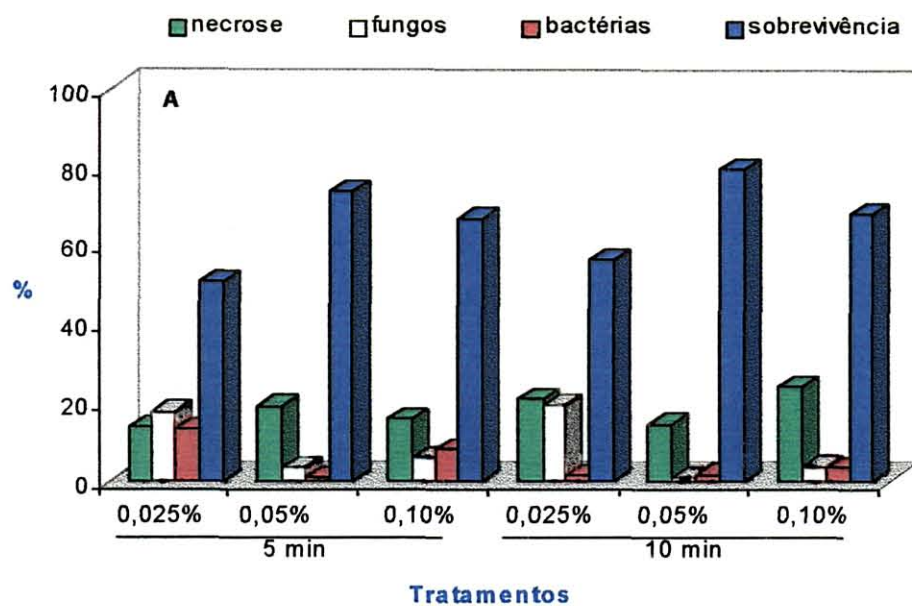


FIGURA 4. COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO COM HgCl_2 EM BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* REALIZADOS NO INVERNO (A) E PRIMAVERA DE 1993.

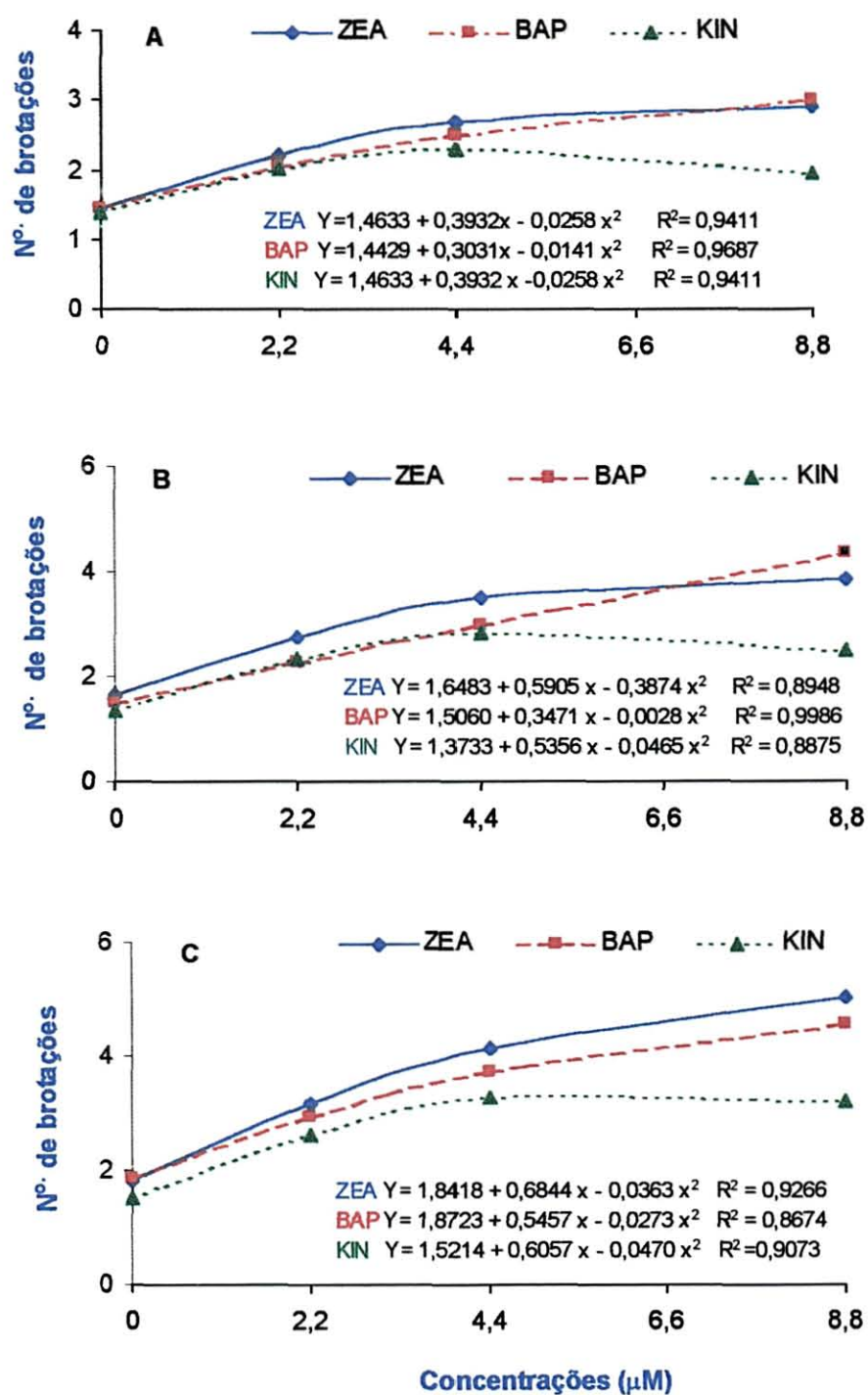


FIGURA 5. EFEITO DOS NÍVEIS DE FITORREGULADORES NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL (A), PRIMEIRO (B) E SEGUNDO (C) SUBCULTIVO.

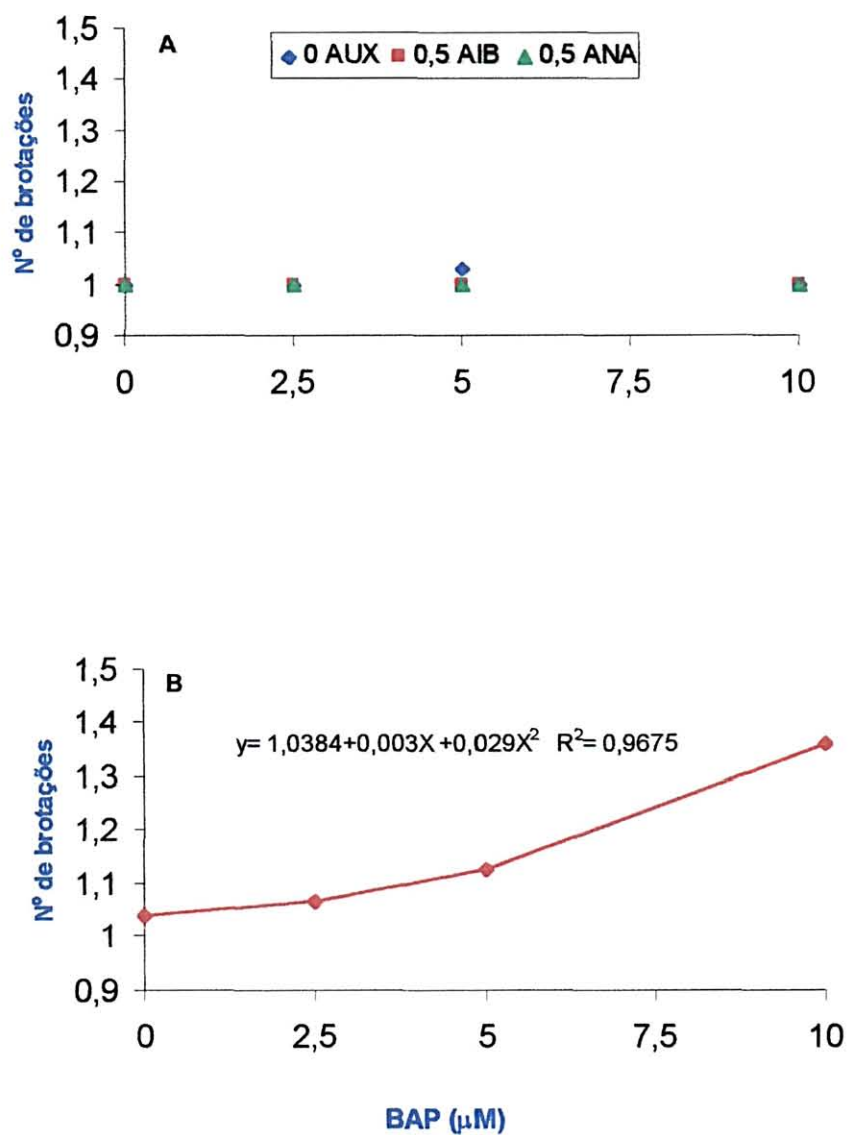


FIGURA 6. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA, NA TAXA MÉDIA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, OBTIDAS NO CULTIVO INICIAL DE EXPLANTES DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO*.

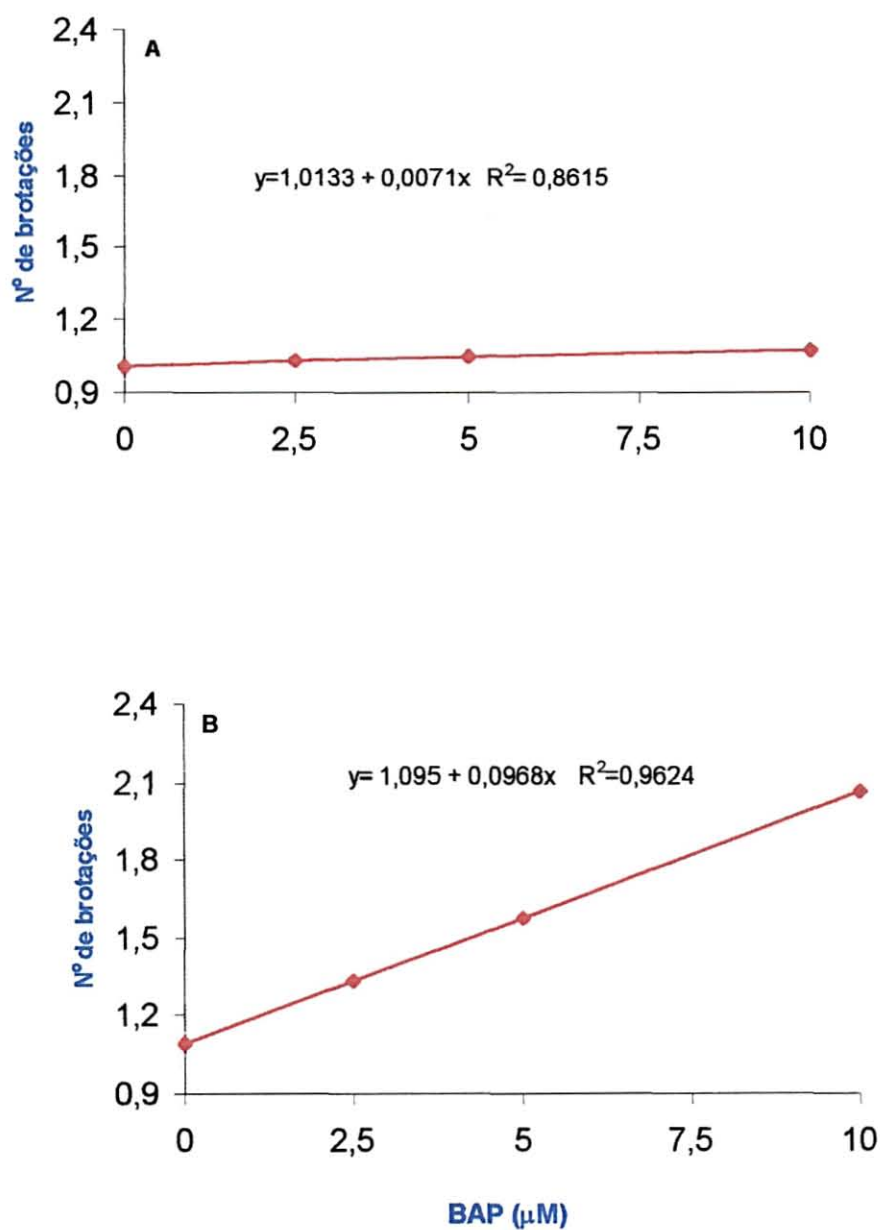


FIGURA 7. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA NA TAXA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, OBTIDAS NO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM SEGMENTOS ORIUNDOS DA REGIÃO DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO*.

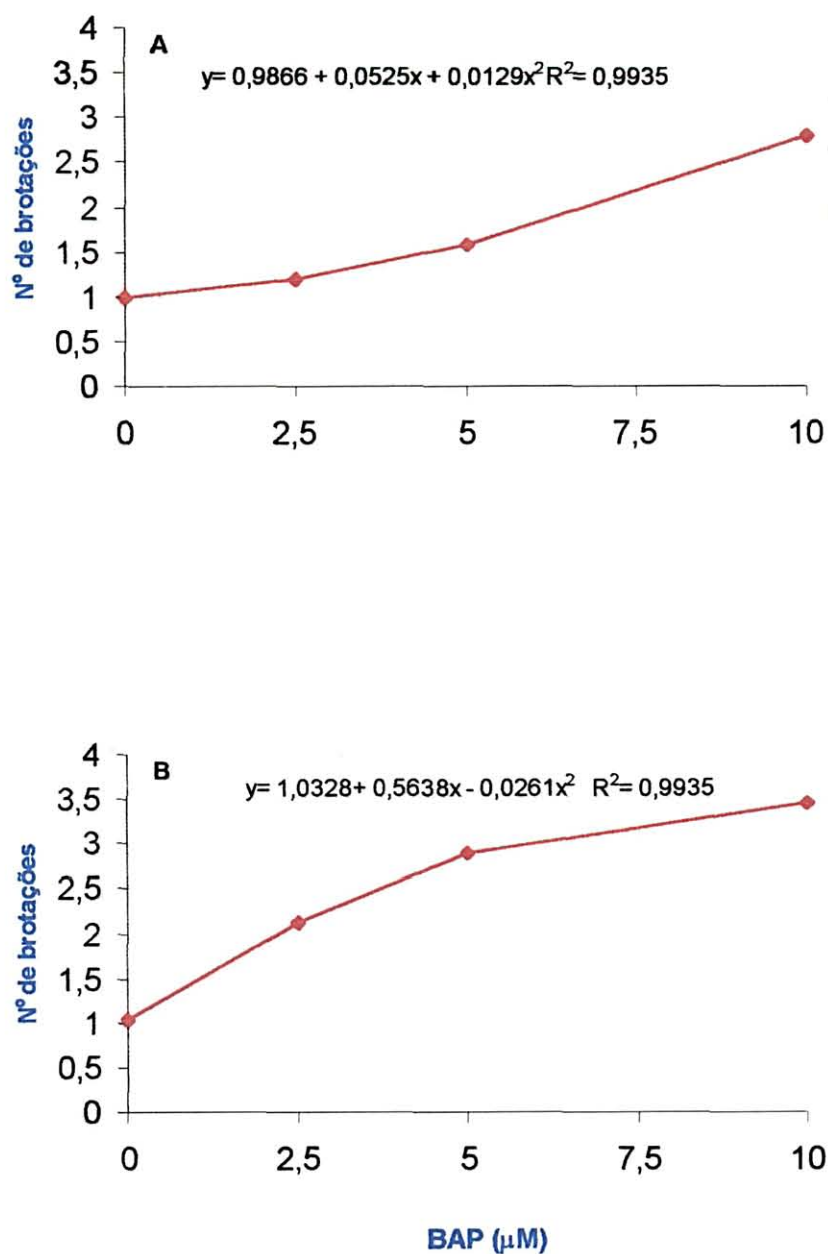


FIGURA 8. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA NA TAXA DE REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, OBTIDAS NO SEGUNDO SUBCULTIVO EM SEGMENTOS ORIUNDOS DA REGIÃO DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO*.

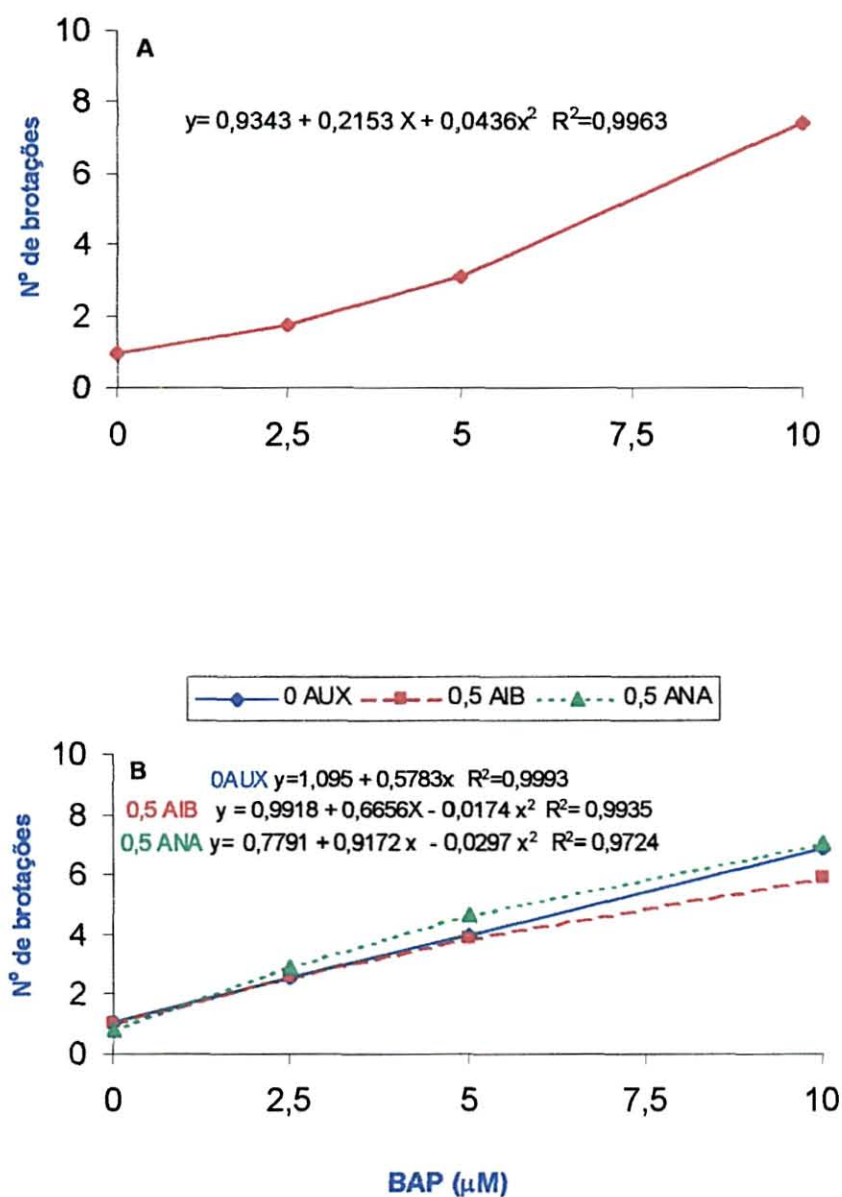


FIGURA 9. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM BAP, COMBINADOS OU NÃO COM AIB OU ANA NA TAXA DE REGENERAÇÃO MÉDIA DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, OBTIDAS NO TERCEIRO SUBCULTIVO EM SEGMENTOS ORIUNDOS DA REGIÃO DO EPICÓTILO (A) E HIPOCÓTILO (B) DE SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO*.

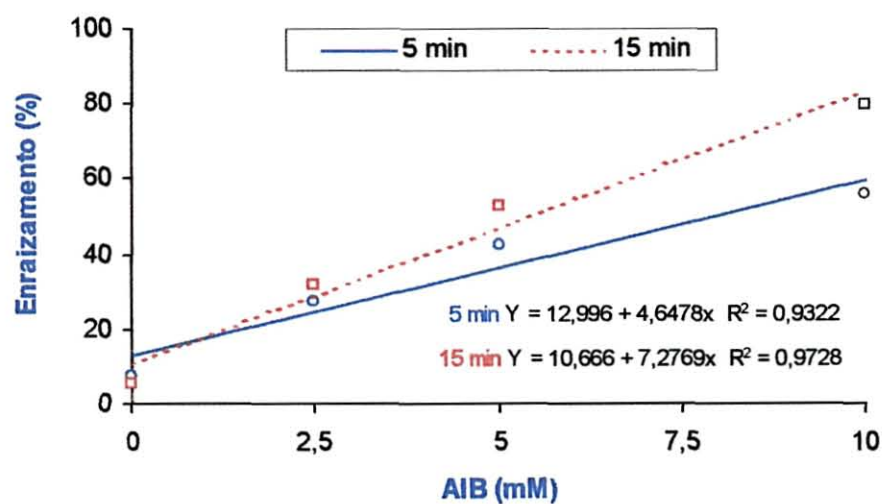


FIGURA 10. EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB, NO ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*.

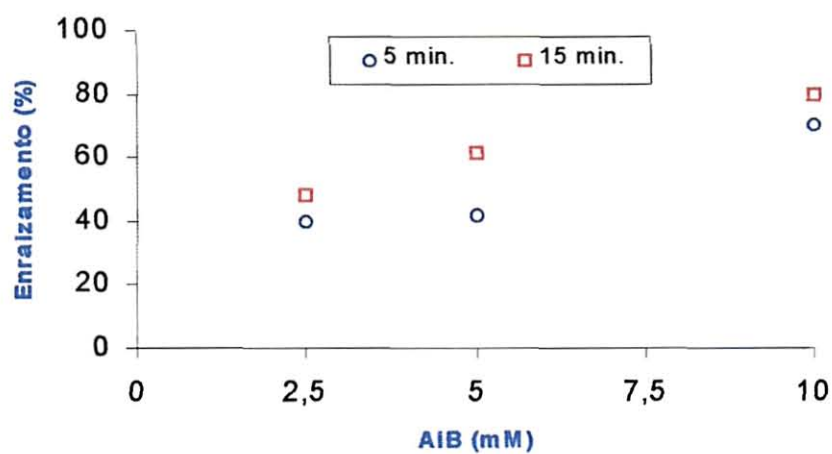


FIGURA 11. EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB (pH=5,6), NO ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*.

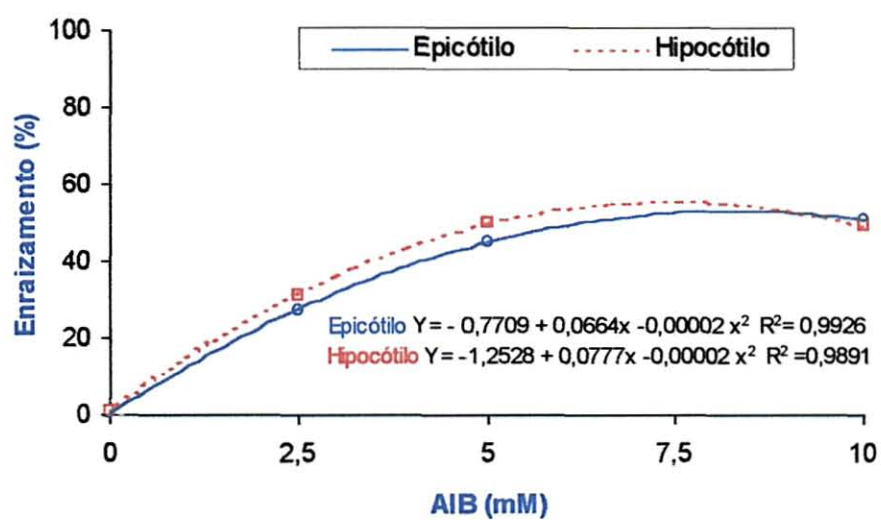


FIGURA 12. EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB, NO ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, ORIGINADAS DA REGIÃO DO EPICÓTILO E HIPOCÓTILO.

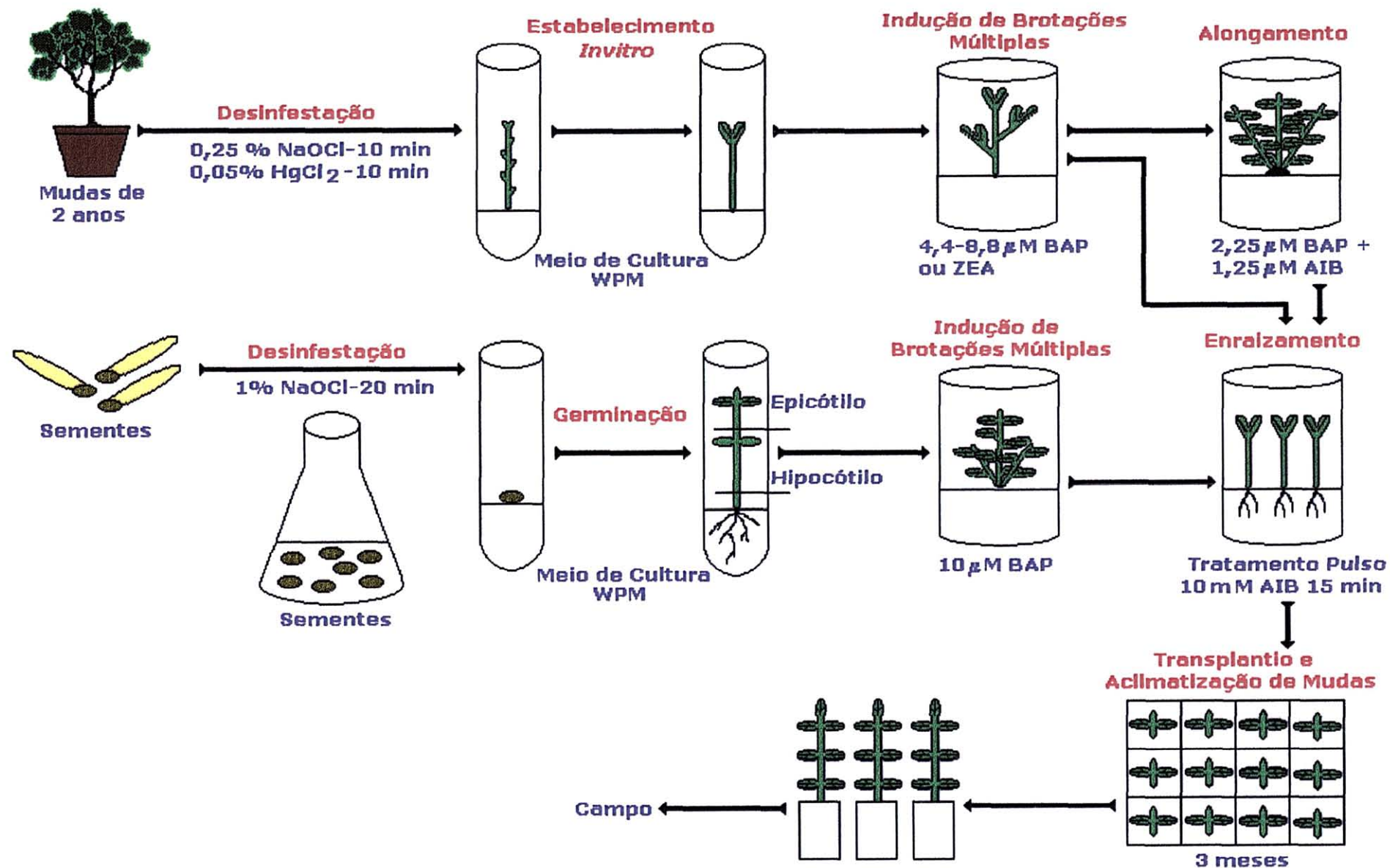


FIGURA 13. PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *A. polyneuron* PELA ROTA ORGANOGENÉTICA.

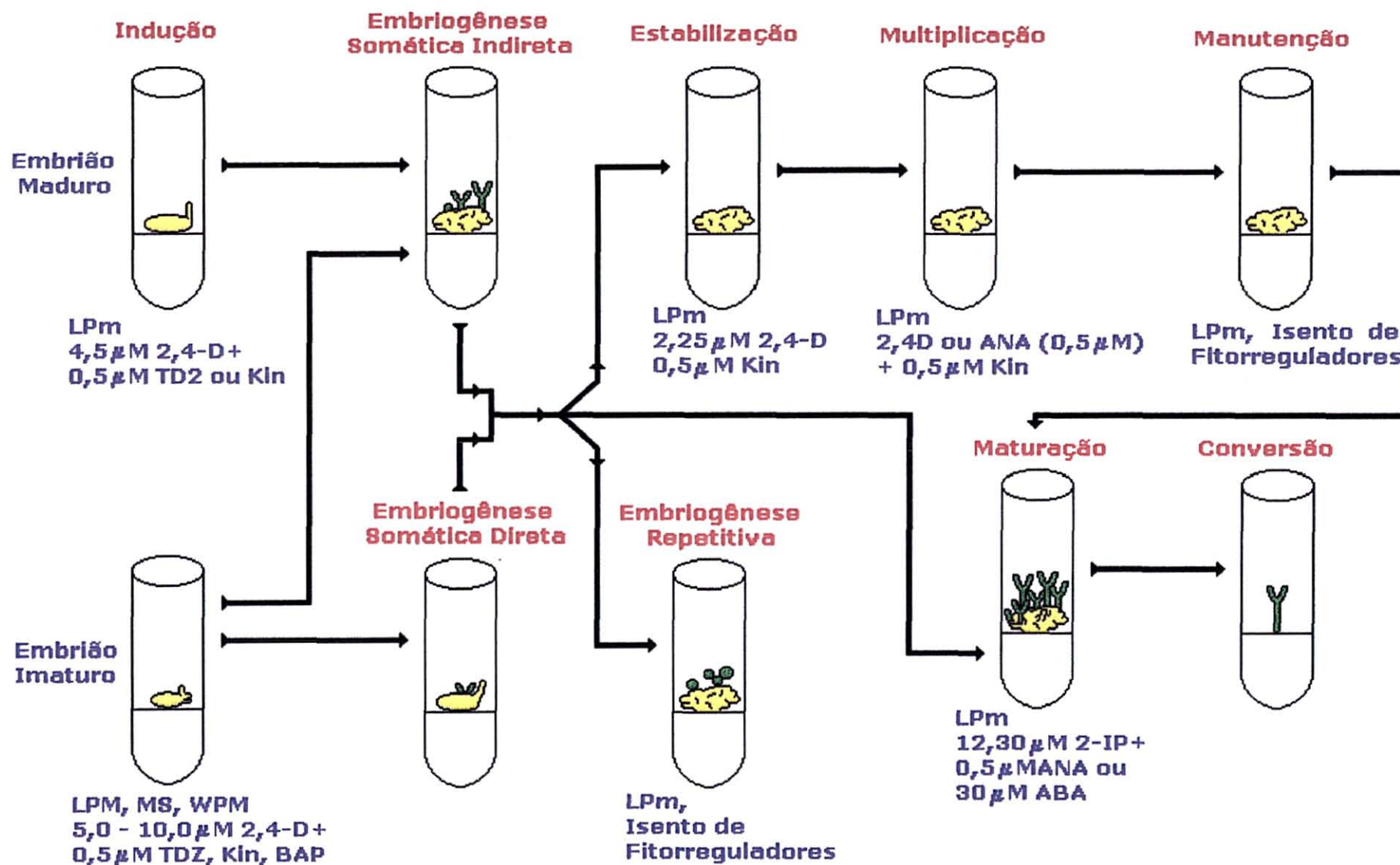


FIGURA 14. ROTAS DE INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS EMBRIOGENÉTICAS DE *A. polyneuron*.

FIGURA 15. *Aspidosperma polyneuron*. **A-** ASPECTO GERAL DA ÁRVORE; **B-** E **C-** FRUTOS IMATUROS; **D-** SEMENTES IMATURAS COLETADAS NO MÊS DE JUNHO NO INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO; **E-** EMBRIÕES DE SEMENTE POLIEMBRIÔNICA.

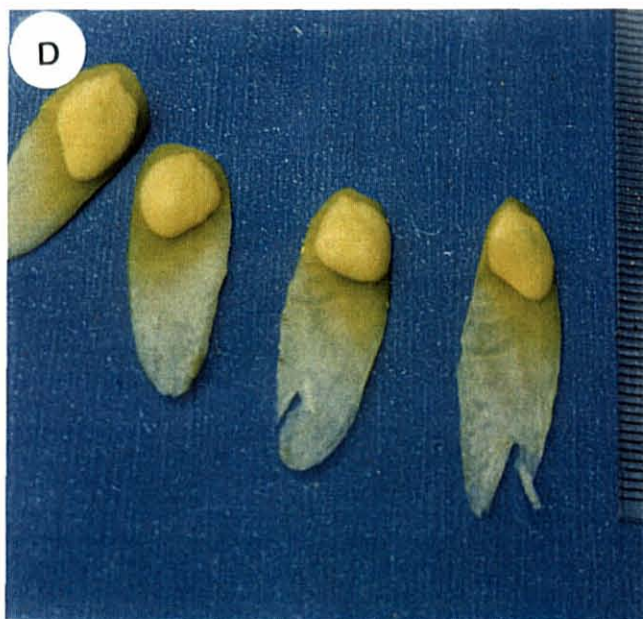
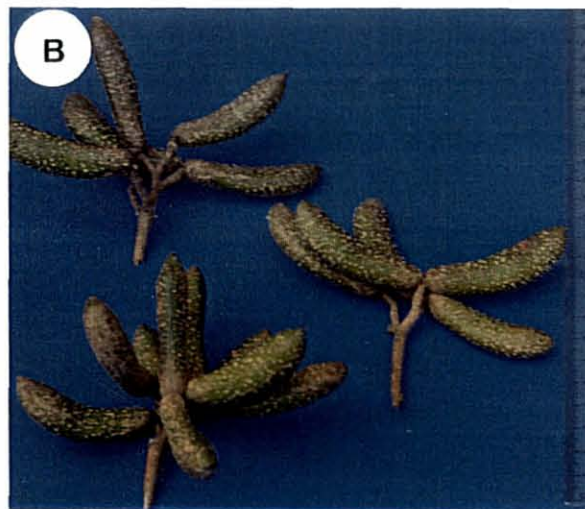
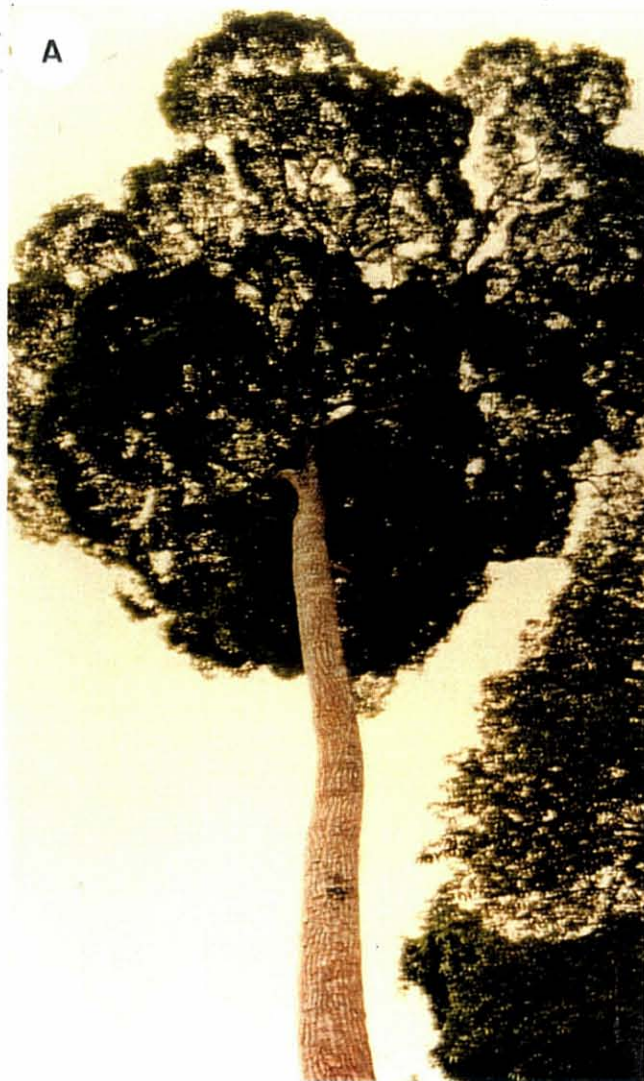


FIGURA 16. A- MUDAS DE *A. polyneuron*, COM DOIS ANOS DE IDADE, CRESCENDO EM CASA DE VEGETAÇÃO CLIMATIZADA; **B-** DETALHE DAS BROTAÇÕES APICAIS PULVERIZADAS COM BENOMYL ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$); **C-** E **D-** BROTAÇÕES EMITIDAS APÓS PODAS REALIZADAS NO INVERNO (JUNHO E JULHO); **E-** E **F-** EXPLANTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS 1 E 2 DA ETAPA DE OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS.

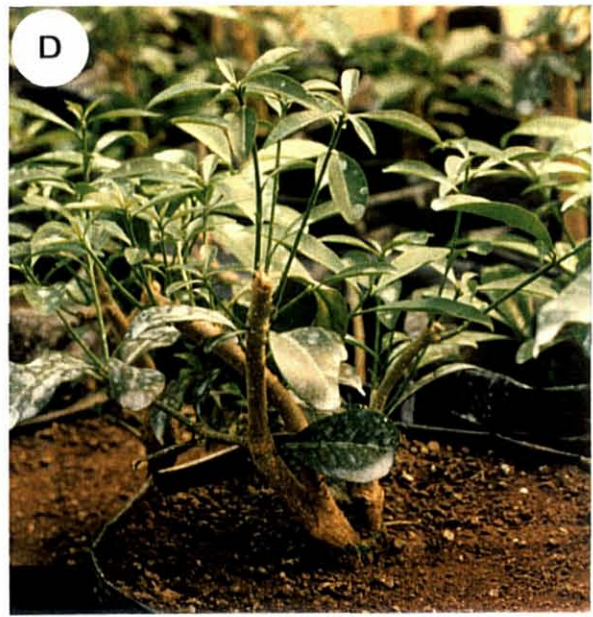
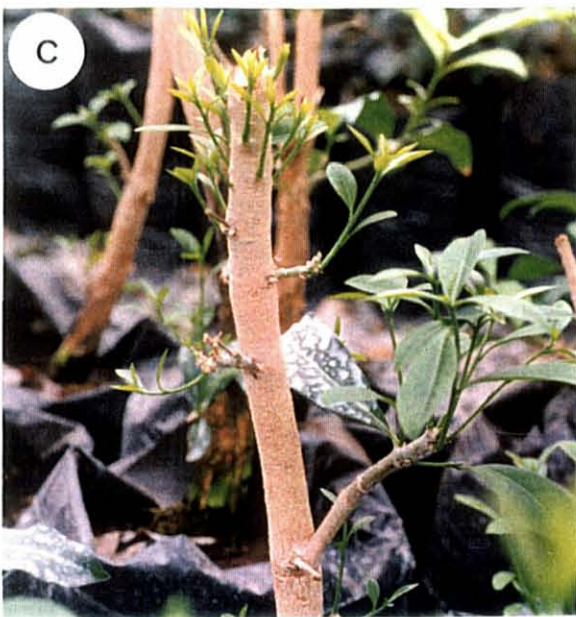
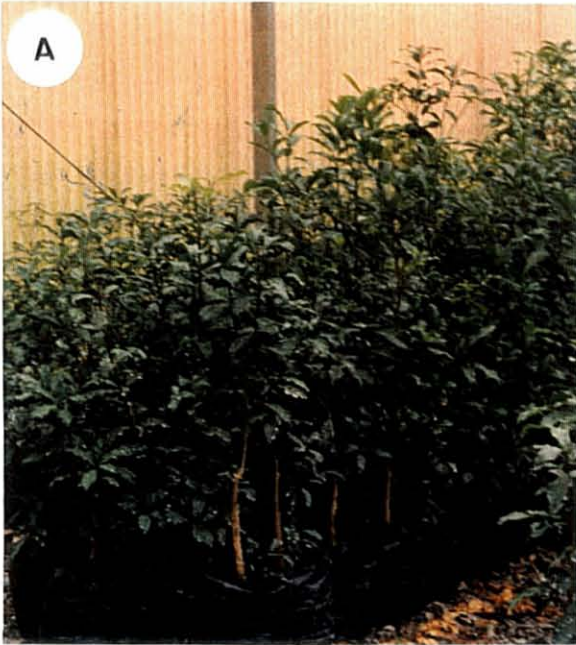


FIGURA 17. A- ESTABELECIMENTO DOS EXPLANTES DE *A. polyneuron* EM MEIO DE CULTURA MS/2; **B-D** CULTIVO INICIAL DE BROTAÇÕES EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM: **B-** 2,25 μM DE Cin E 1,25 μM DE AIB; **C-** 4,45 μM DE ZEA E 1,25 μM DE AIB; **D-** 8,8 μM DE BAP; **E-G** BROTAÇÕES DO PRIMEIRO SUBCULTIVO SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM: **E-** 8,8 μM DE Cin; **F-** 8,8 μM DE ZEA; **G-** 4,4 μM DE BAP; **H-** BROTAÇÕES OBTIDAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM 8,8 μM DE BAP; **I-** BROTAÇÕES OBTIDAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE 0,25 μM DE TDZ E TRANSFERIDAS PARA MEIO BASAL, ISENTO DE FITORREGULADORES E COM 0,1% DE CARVÃO ATIVADO; **J-** BROTAÇÕES OBTIDAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE 2,25 μM DE BAP E 1,25 μM DE AIB.



FIGURA 18. A- GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES POLIEMBRIÔNICAS DE *A. polyneuron* EM MEIO BASAL WPM; B-D BROTAÇÕES DO EPICÓTILO DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM: B- 8,8 μ M DE Cin; C- 8,8 μ M DE ZEA E D- 8,8 μ M DE TDZ; E-F BROTAÇÕES DO TERCEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM: E-10 μ M DE BAP; F- 10 μ M DE BAP E 0,5 μ M DE AIB.

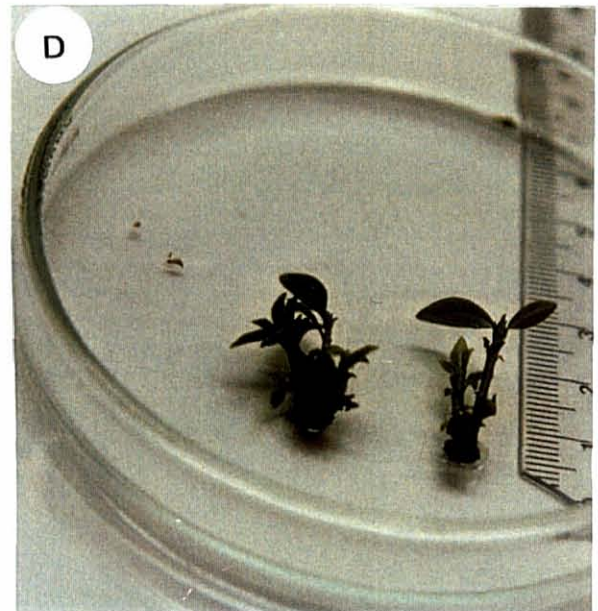
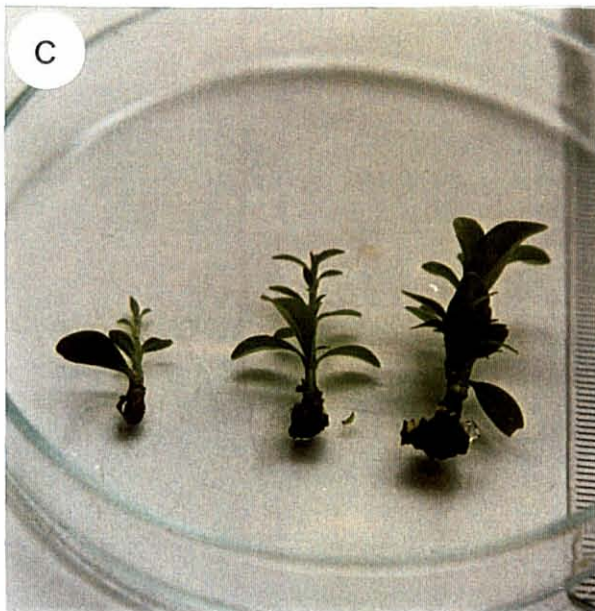
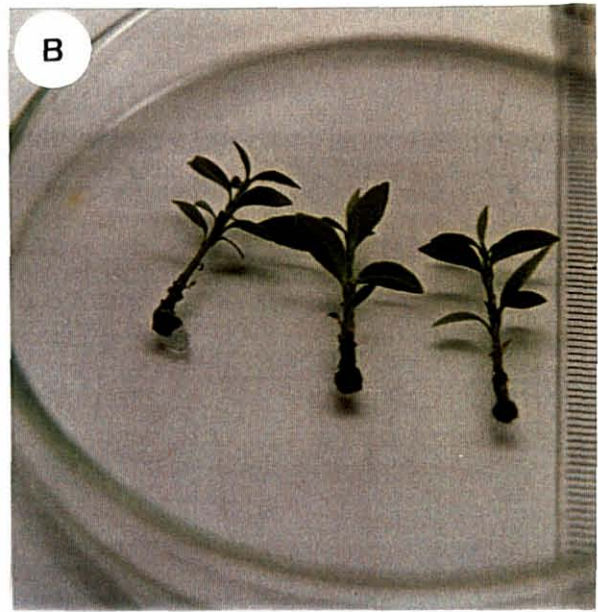


FIGURA 19. A- BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron* ENRAIZADAS NO MEIO DE CULTURA DE ESTABELECIMENTO WPM; B- BROTAÇÕES DO EPICÓTILO ENRAIZADAS DURANTE CULTIVO INICIAL EM MEIO DE CULTURA WPM, COM 0,5 μ M DE AIB; C- BROTAÇÃO DO EPICÓTILO DO TERCEIRO SUBCULTIVO, ENRAIZADA COM 5 mM DE AIB DURANTE 15 MINUTOS; D- BROTAÇÃO DO HIPOCÓTILO ENRAIZADA COM 10mM DE AIB, DURANTE 15 MINUTOS; E- SOBREVIVÊNCIA DE MUDAS PLANTADAS EM BANDEJA DE SEMEADURA, APÓS UM MÊS DE PERMANÊNCIA EM CASA DE VEGETAÇÃO CLIMATIZADA; F-G MUDAS REGENERADAS *IN VITRO*, APÓS TRÊS MESES DE ACLIMATIZAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO.

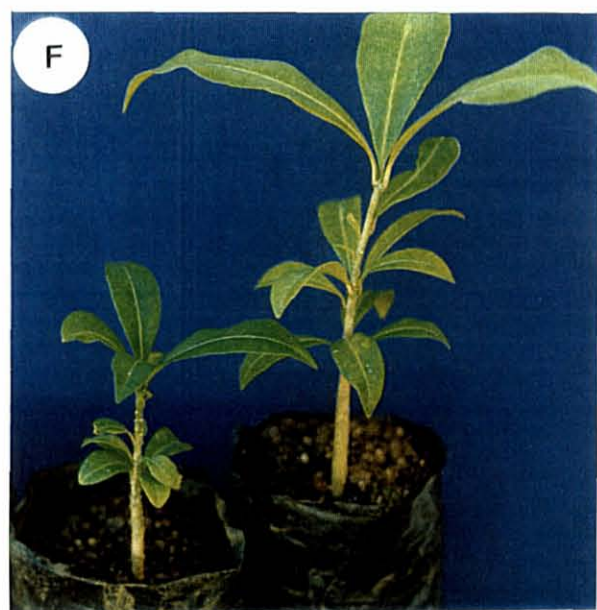
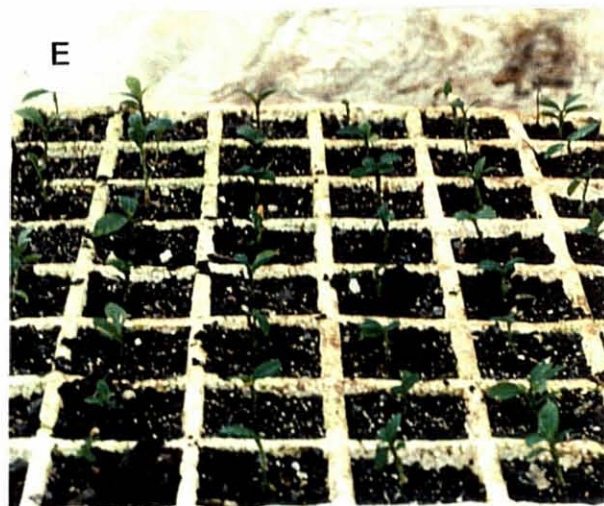
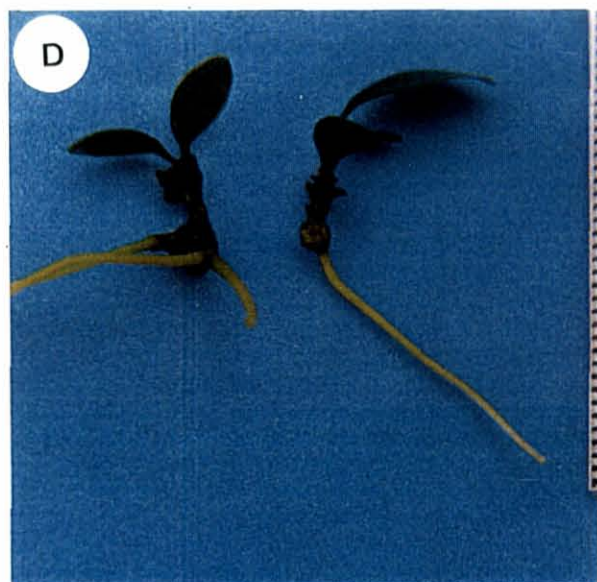


FIGURA 20. A- CALO COMPACTO GRANULOSO DE *A. polyneuron*, OBTIDO DE DISCO FOLIAR E SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM 10 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE Cin, 24 SEMANAS APÓS INOCULAÇÃO (1,25X); B- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS EM SUA SUPERFÍCIE, 12 SEMANAS APÓS INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA LPm, SUPLEMENTADO COM 4,5 μM DE 2,4-D E 0,45 μM DE TDZ (2,5X); C- PARTE DA MASSA CELULAR (B) SUBCULTIVADA PARA MEIO DE CULTURA LPm, ADICIONADO DE 2,25 μM DE 2,4-D E 0,45 μM DE Cin, APÓS 8 SEMANAS DA INOCULAÇÃO (2,5 X); D- OUTRA PARTE DA MASSA CELULAR SUBCULTIVADA PARA MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 12,30 μM DE 2-iP E 0,5 μM DE ANA, APÓS 8 SEMANAS DA INOCULAÇÃO (2,5X); E- MASSA CELULAR MOSTRANDO ASSINCRONIA DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO BASAL LPm, ISENTO DE FITORREGULADORES, APÓS 4 SUBCULTIVOS (2,5X); F- EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES, APÓS 20 SEMANAS DA INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM 4,5 μM DE 2,4-D E 0,45 μM DE BAP (1,9 X).

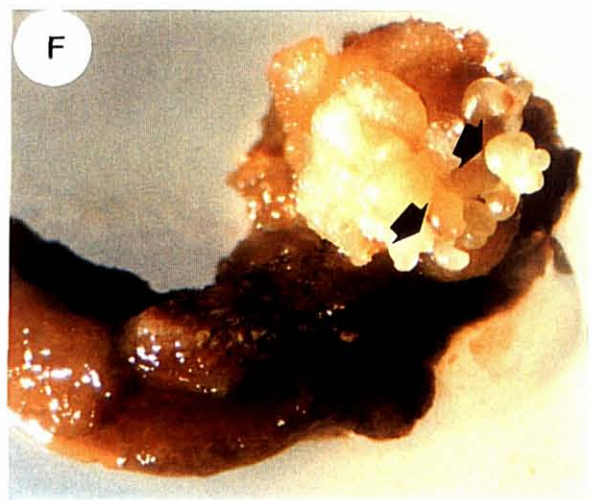
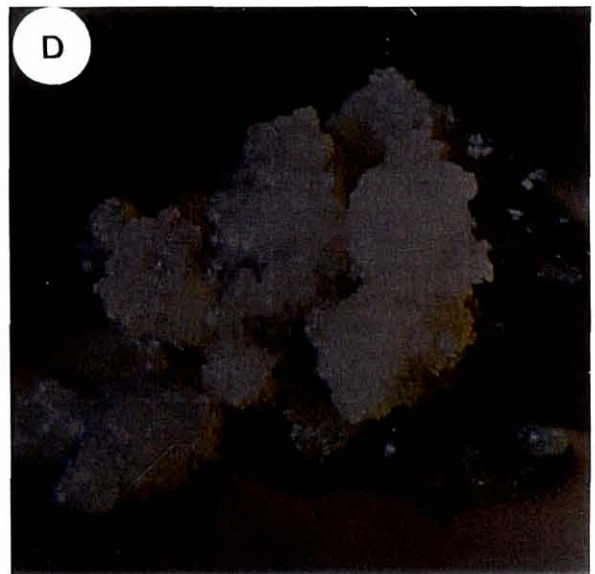
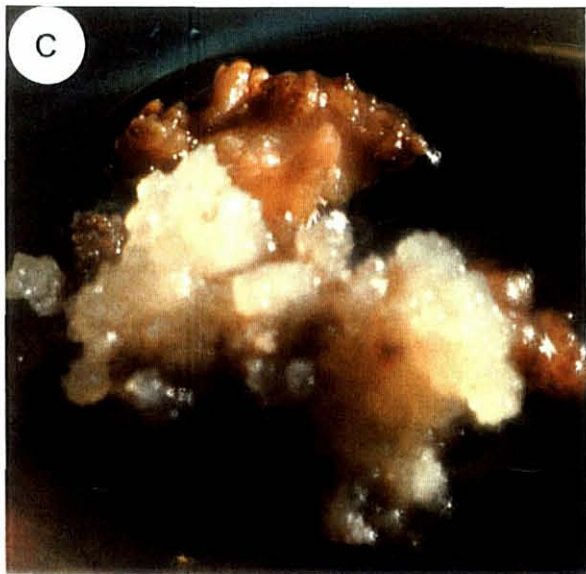
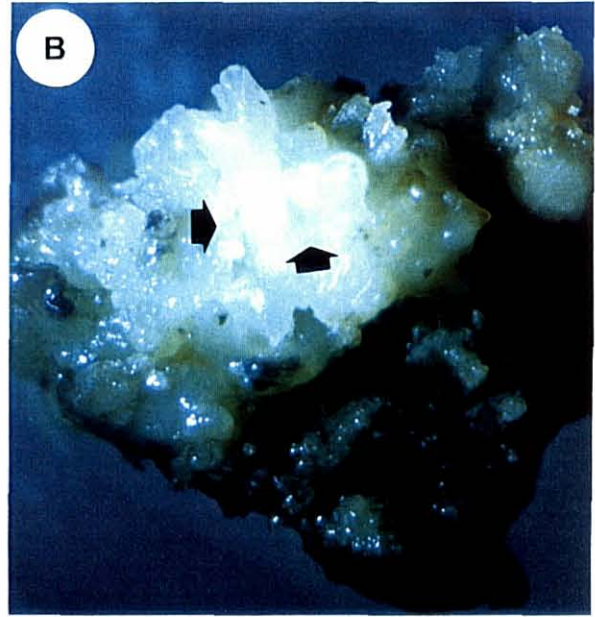
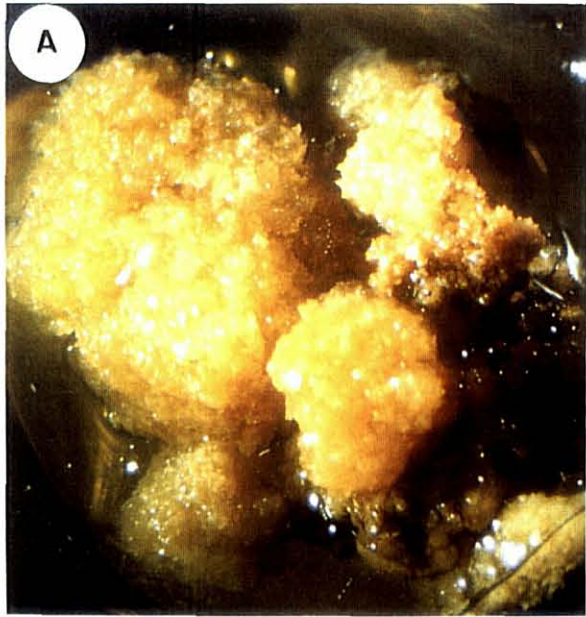


FIGURA 21. A- CALO COMPACTO COM EMBRIÃO SOMÁTICO NA SUA SUPERFÍCIE, APÓS 20 SEMANAS DA INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE $4,5\mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,45\mu\text{M}$ DE BAP (1,25X); **B-** EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES INDUZIDOS NA REGIÃO COTILEDONAR DE EMBRIÕES IMATUROS, APÓS 18 SEMANAS DA INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE $10\mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,5\mu\text{M}$ DE Cin (3,1X); **C-** FORMAÇÃO DE MASSA CELULAR NA REGIÃO COTILEDONAR DE UM EMBRIÃO IMATURO PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA, SUPLEMENTADO COM $1,25\mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,5\mu\text{M}$ DE Cin, APÓS CINCO SUBCULTIVOS (1,25X); **D E E-** EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES FORMADOS NA REGIÃO DO NÓ COTILEDONAR, EM MEIO DE CULTURA LPm, COM $5\mu\text{M}$ DE 2,4-D, $0,5\mu\text{M}$ DE Cin E $0,5\mu\text{M}$ DE BAP, APÓS SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA LPm, SUPLEMENTADO COM $24,6\mu\text{M}$ DE 2-iP E $0,45\mu\text{M}$ DE ANA (D- 1,25X E E-3,1X); **F-G-** EMBRIÕES SOMÁTICOS INDUZIDOS EM MEIO DE CULTURA MS, ACRESCIDO DE: **F-** $10\mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,5\mu\text{M}$ DE Cin (1,9X) E **G-** $5\mu\text{M}$ DE 2,4-D E $0,5\mu\text{M}$ DE TDZ (1,9X).

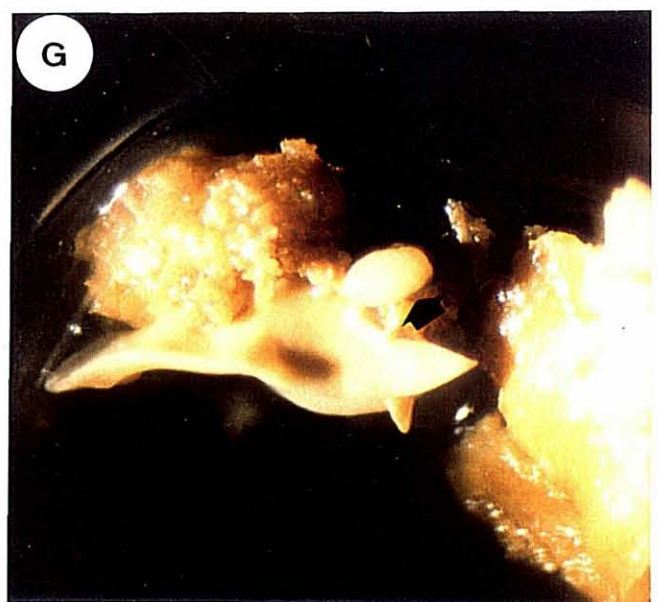
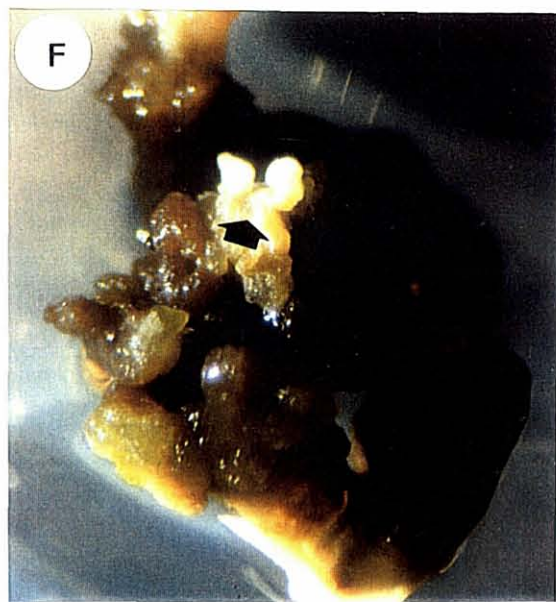
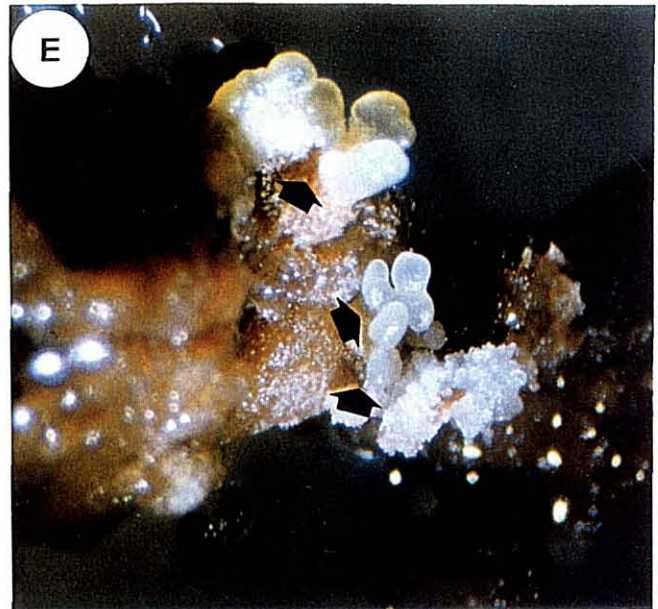
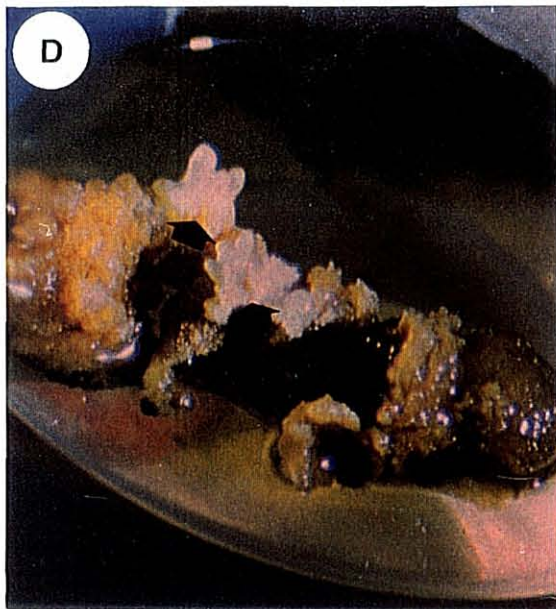
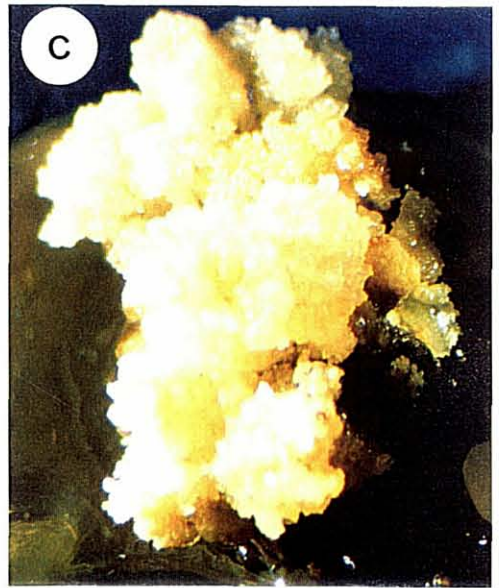
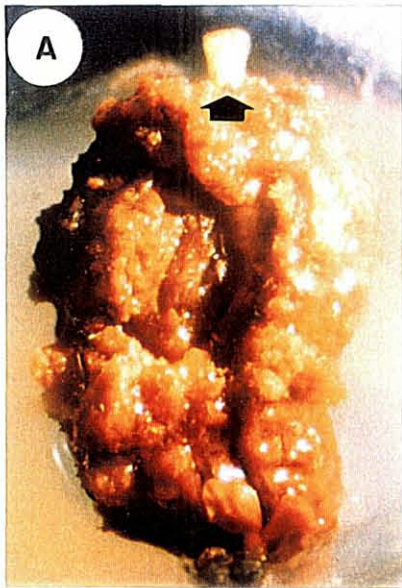


FIGURA 22. A- MASSA CELULAR EMBRIOGENÉTICA, GRANULAR E FRIÁVEL, PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPM, ADICIONADO DE 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE Cin (1,9X); **B-** MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES, OBTIDA A PARTIR DE EMBRIÃO IMATURO E SE DESENVOLVENDO APÓS CINCO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 1,25 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE Cin (1,9X); **C-** MASSA CELULAR PROLIFERANDO EM MEIO BASAL LPM, ISENTO DE FITORREGULADORES, APÓS 12 SUBCULTIVOS (1,25X); **D-** MASSA CELULAR GRANULOSA FINA, OBTIDA APÓS 10 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 12,30 μM DE 2-iP E 0,5 μM DE ANA (1,25X); **E-** EMBRIÕES SOMÁTICOS SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM 12,30 μM DE 2-iP E 0,5 μM DE ANA (1,9X); **F-** EMBRIÃO SOMÁTICO NO ESTÁGIO TORPEDO SUBCULTIVADO PARA MEIO BASAL LPm (1,9X).

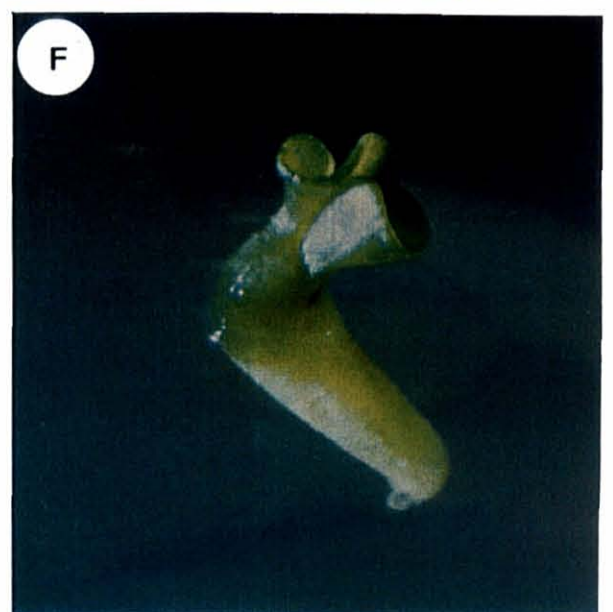
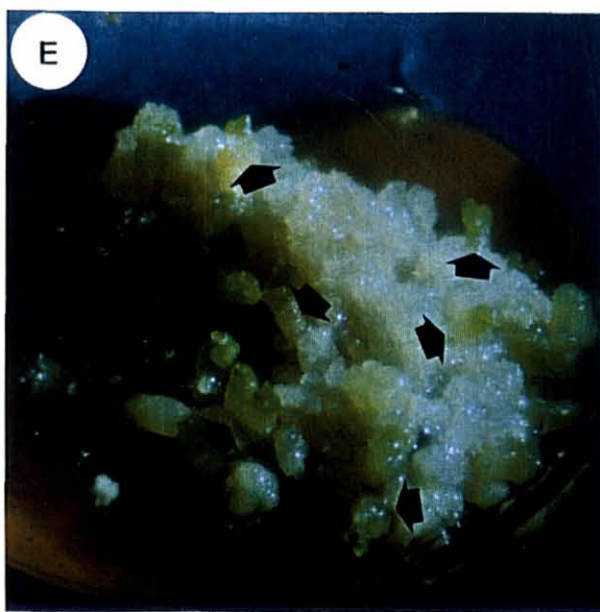
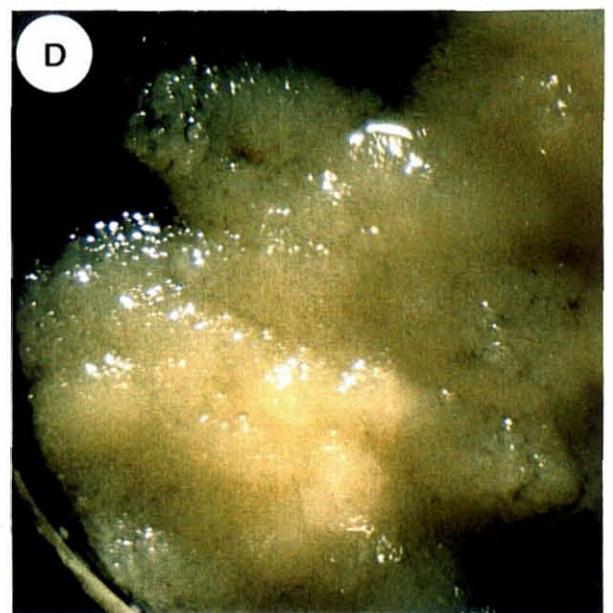
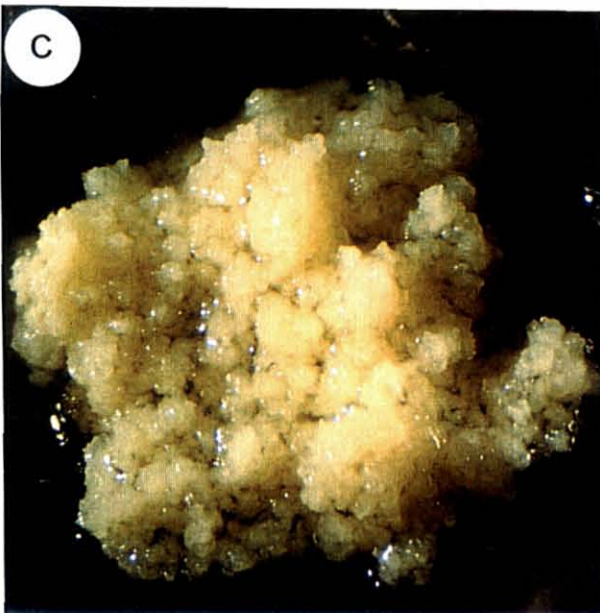
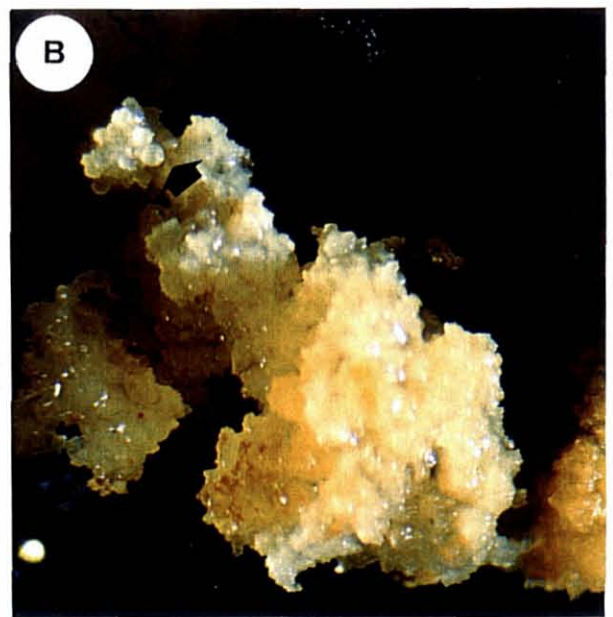
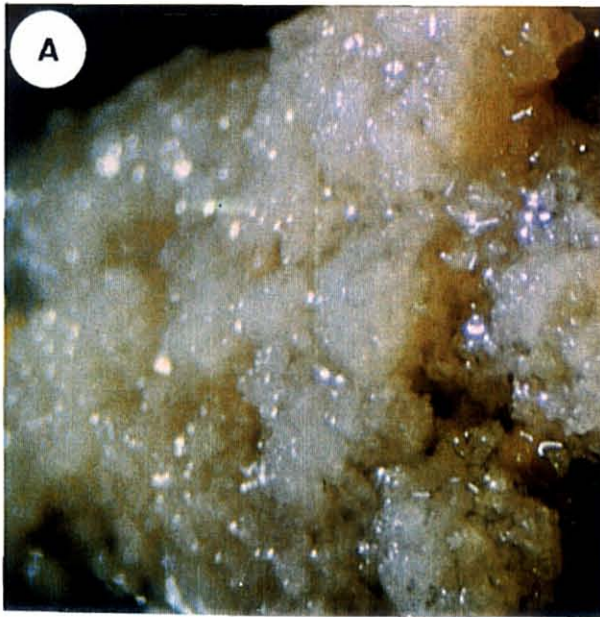


FIGURA 23. A- MASSA CELULAR PROLIFERANDO E COM EMBRIÕES SOMÁTICOS SE DESENVOLVENDO DE FORMA ASSINCRÔNICA, EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 12,30 μM DE 2-iP E 0,5 μM DE ANA, APÓS 9 SUBCULTIVOS; **B-**MASSA CELULAR CULTIVADA EM MEIO BASAL LPm, COM 0,1% DE CARVÃO ATIVADO (1,25X); **C-** EMBRIOGÊNESE REPETITIVA EM MEIO BASAL LPm, ISENTO DE FITORREGULADORES (3,1X); **D-** MASSA CELULAR COM ALTA FREQUÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES, SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 30 μM DE ABA (1,25X); **E-**MASSA CELULAR PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPm, COM 5mM DE PEG 8000 (1,25X); **F-** EMBRIÕES SOMÁTICOS ANORMAIS (FASCIAÇÃO), INDUZIDOS EM MEIO DE CULTURA LPm, SUPLEMENTADO COM 12,30 μM DE 2-iP E 0,5 μM DE ANA, APÓS 12 SUBCULTIVOS (1,9X).

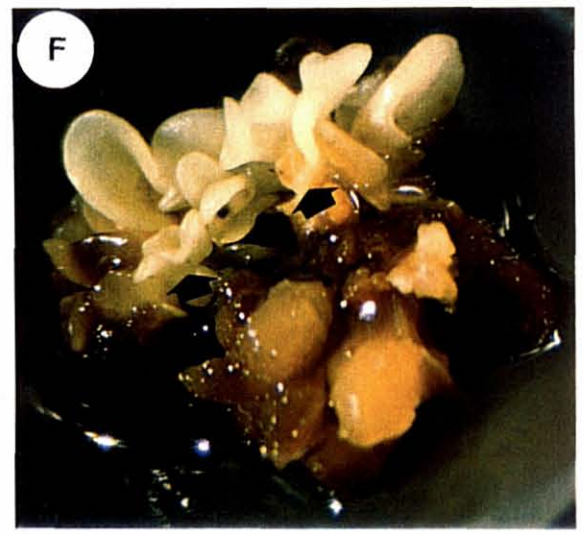
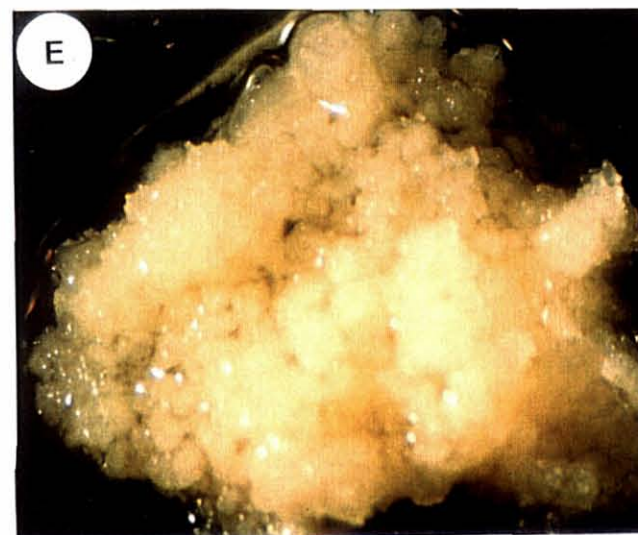
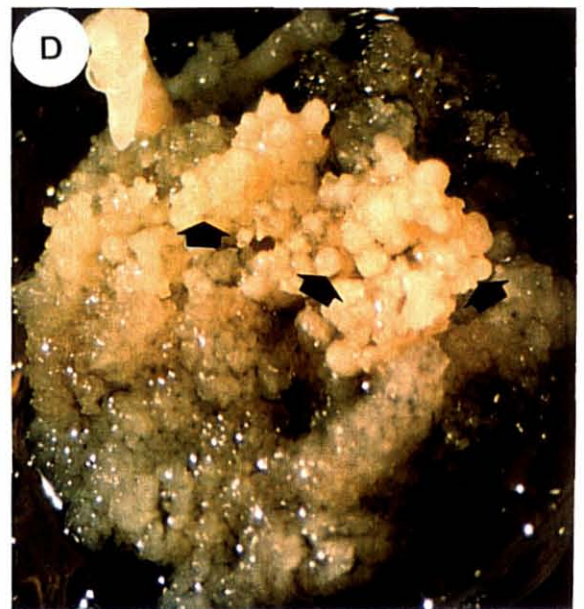
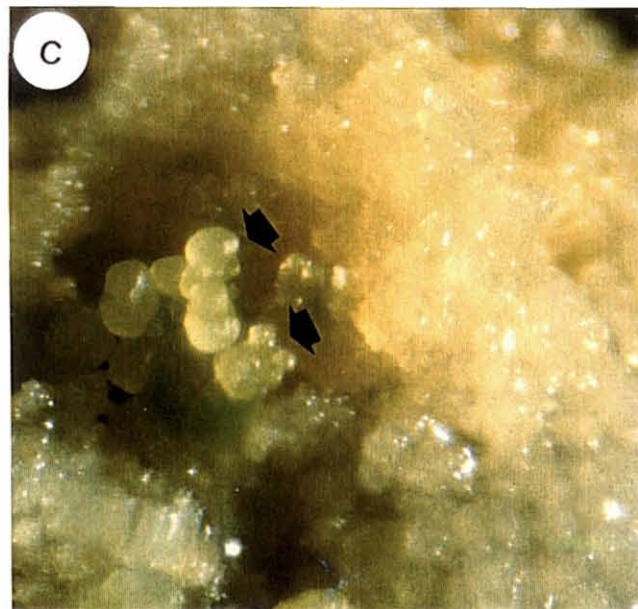
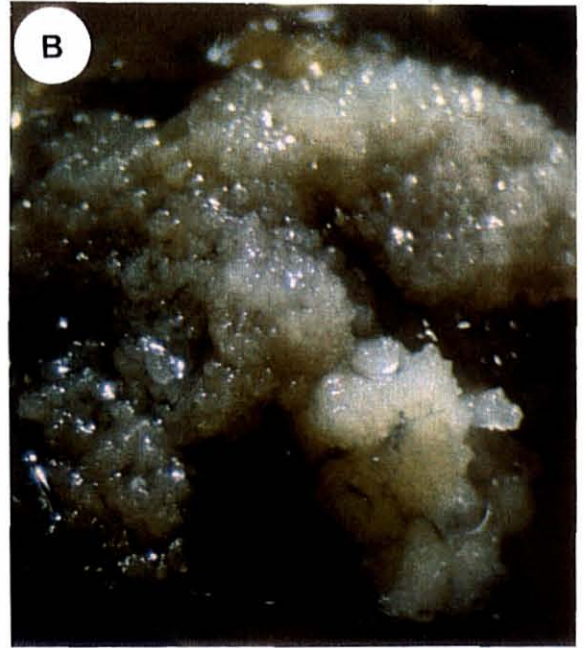
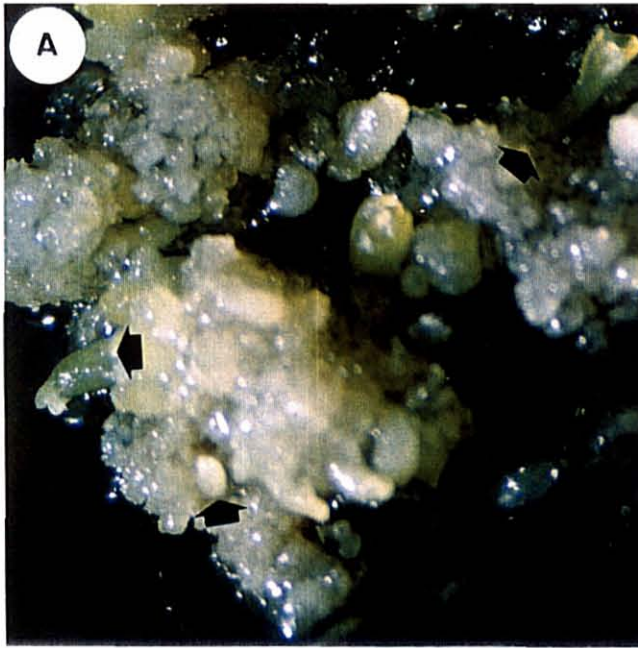


FIGURA 24. SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO DE SEMENTE POLIEMBRIÔNICA DE *A. polyneuron*. (ehr=eixo hipocótilo-radícula, ct= cotilédone, pd= protoderme, mf= meristema fundamental, pc=procâmbio).

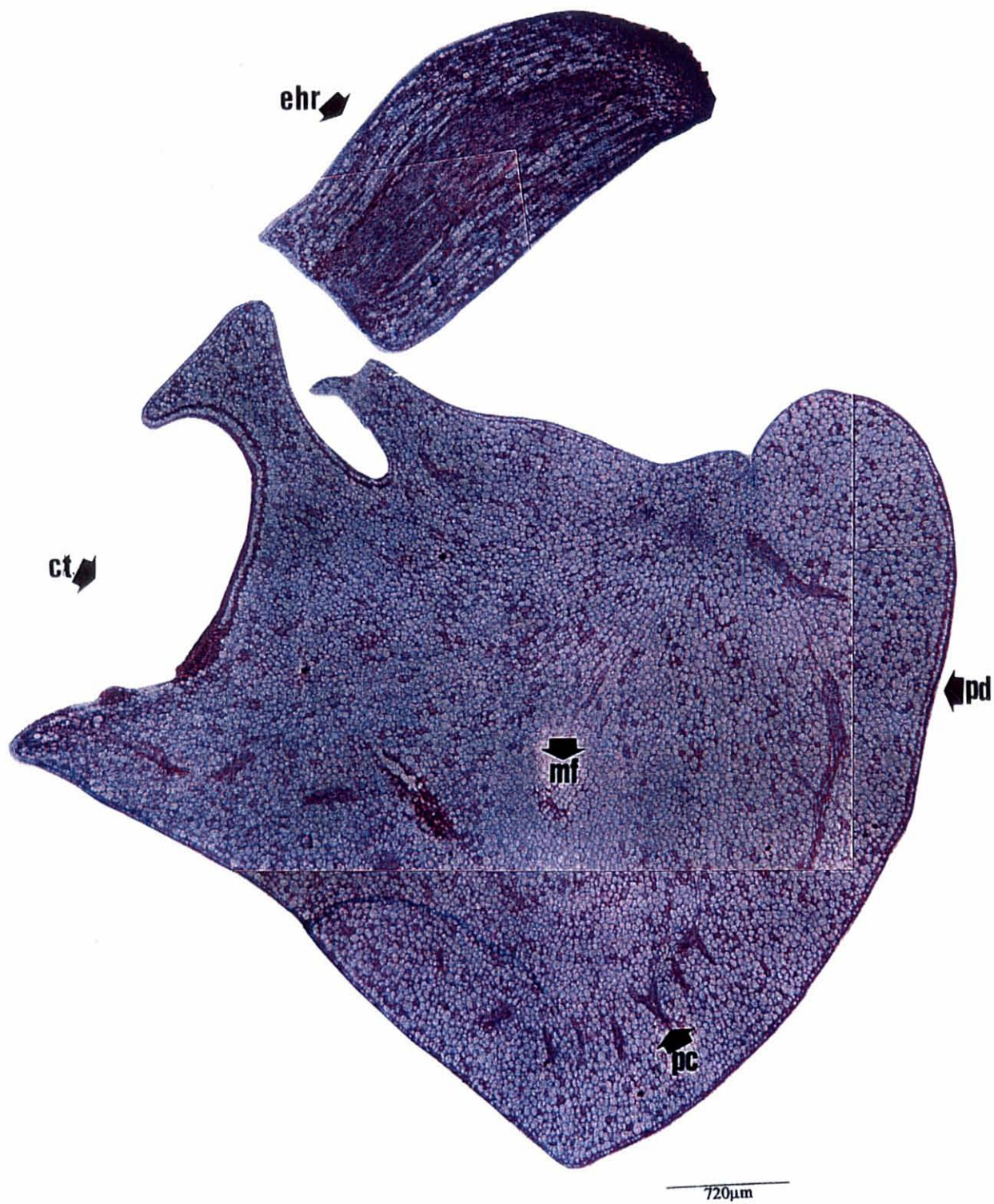


FIGURA 25. A-F ESTÁDIOS DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *A. polyneuron* OBSERVADOS EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM 12,30 μ M DE 2-iP E 0,5 μ M DE ANA. A- SECÇÃO LONGITUDINAL DA FORMAÇÃO DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR, PRÓ-EMBRIÃO (pe), COM CÉLULAS ISODIAMÉTRICAS, EM DIVISÃO ATIVA, COM CITOPLASMA DENSO, NÚCLEO GRANDE E NUCLÉOLO PROEMINENTE; B- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR (eg); C- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO GLOBULAR (eg) E CORDIFORME (ec), D-SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO TORPEDO (et); E- SECÇÃO TRANSVERSAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO CORDIFORME (ec); F- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO COTILEDONAR (ect).

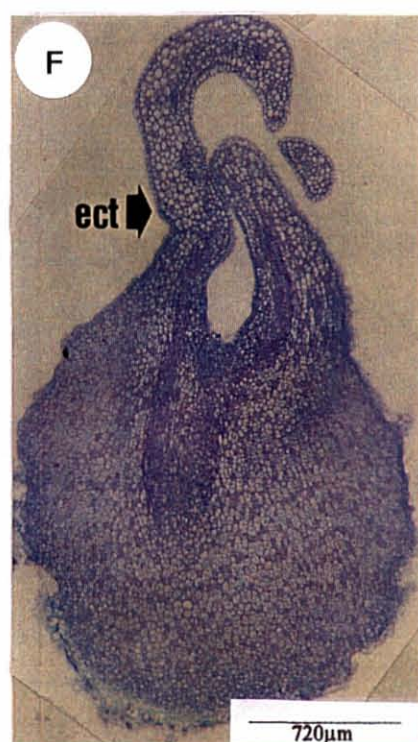
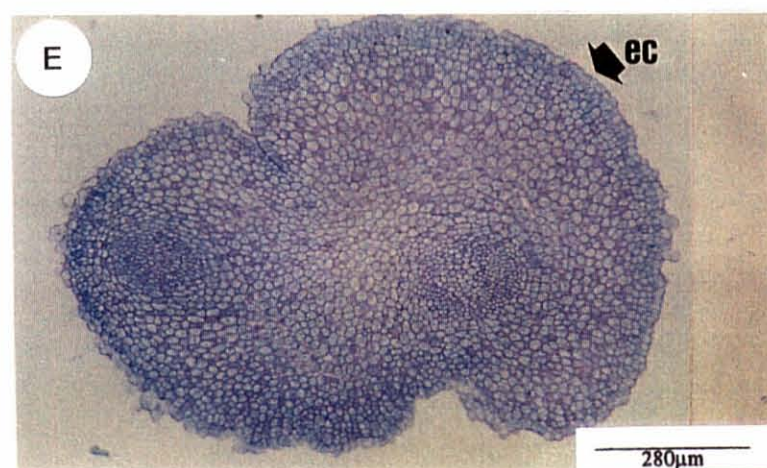
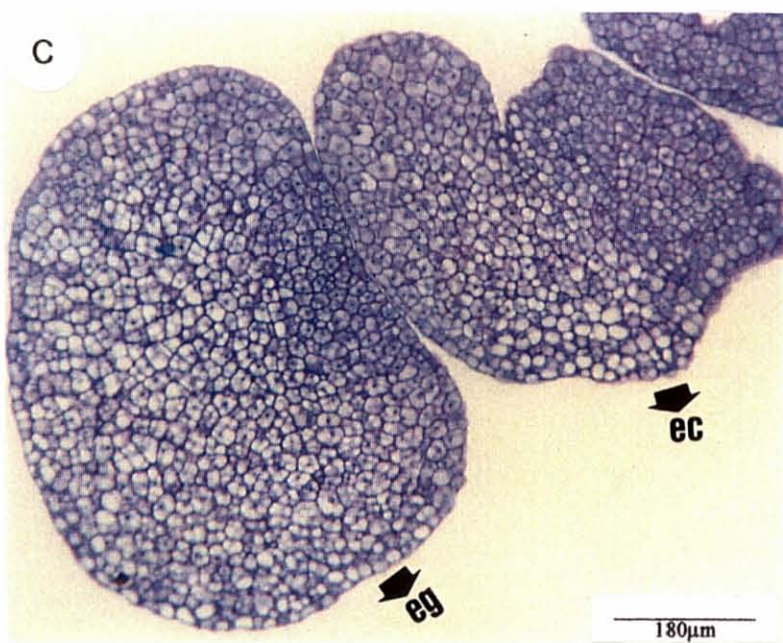
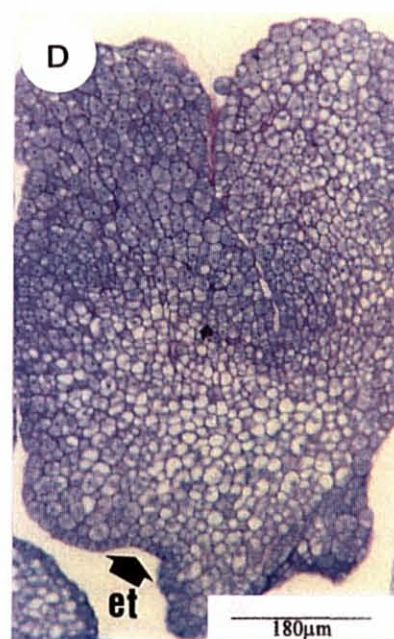
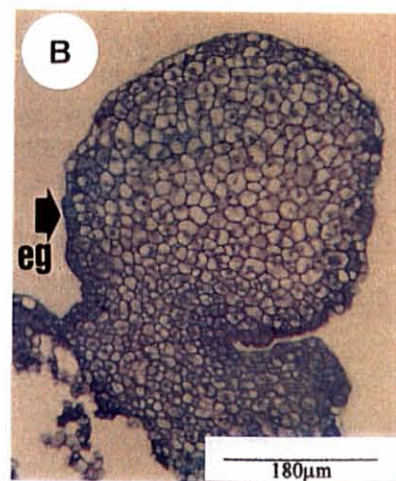
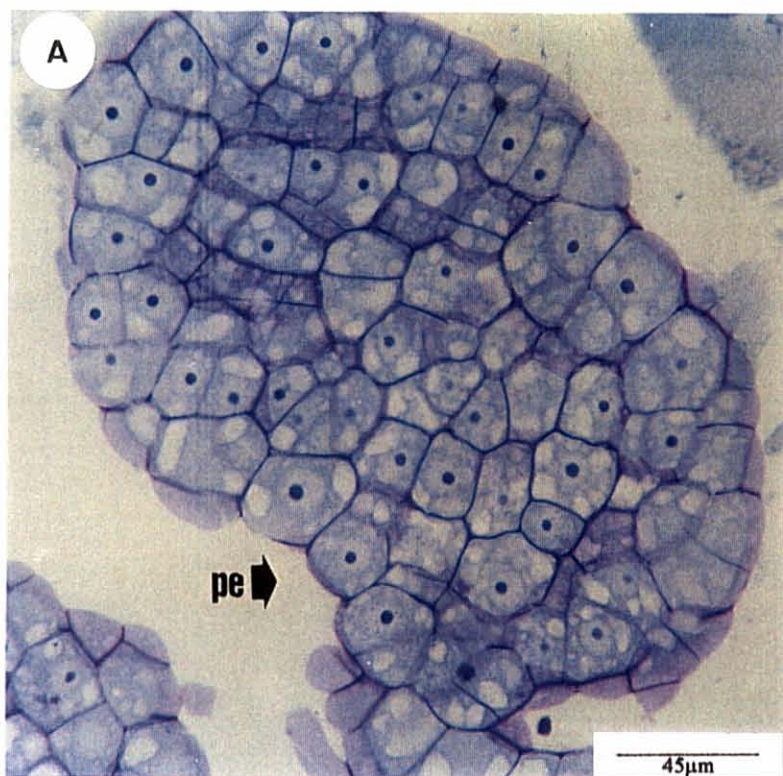


FIGURA 26. SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO COTILEDONAR DE *A. polyneuron*. (ct= cotilédones, pd= protoderme, pc= procâmbio e mf= meristema fundamental).



FIGURA 27. A- SECÇÃO LONGITUDINAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO COTILEDONAR, COM INÍCIO DE FORMAÇÃO DE EMBRIÃO SECUNDÁRIO; B- E C- DIFERENCIAÇÃO DOS PRIMEIROS ELEMENTOS TRAQUEAIS DO PROTOXILEMA; D- DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS NA REGIÃO DO HIPOCÓTILO (es=embrião somático secundário; etp=elemento traqueal do protoxilema).

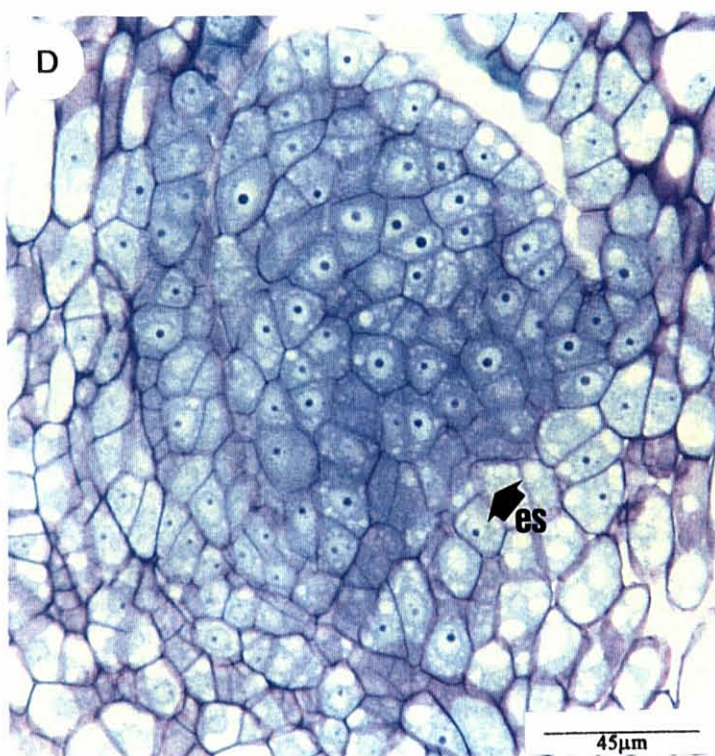
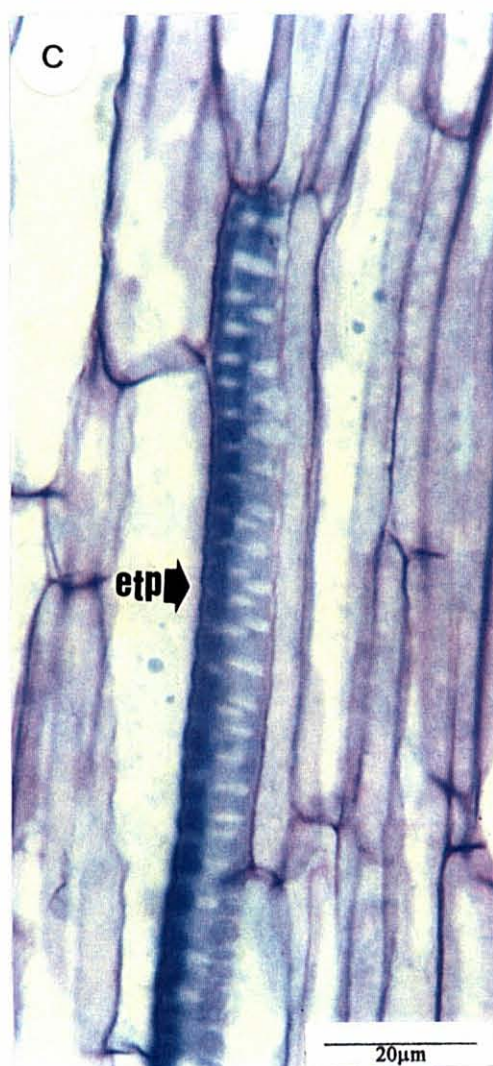
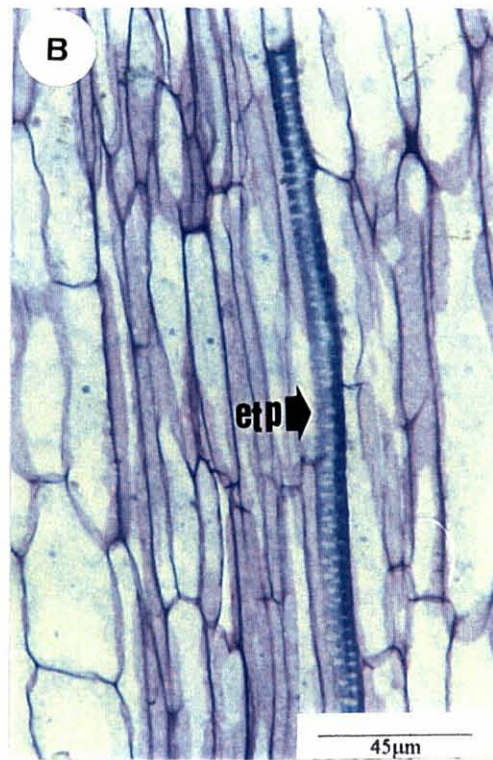
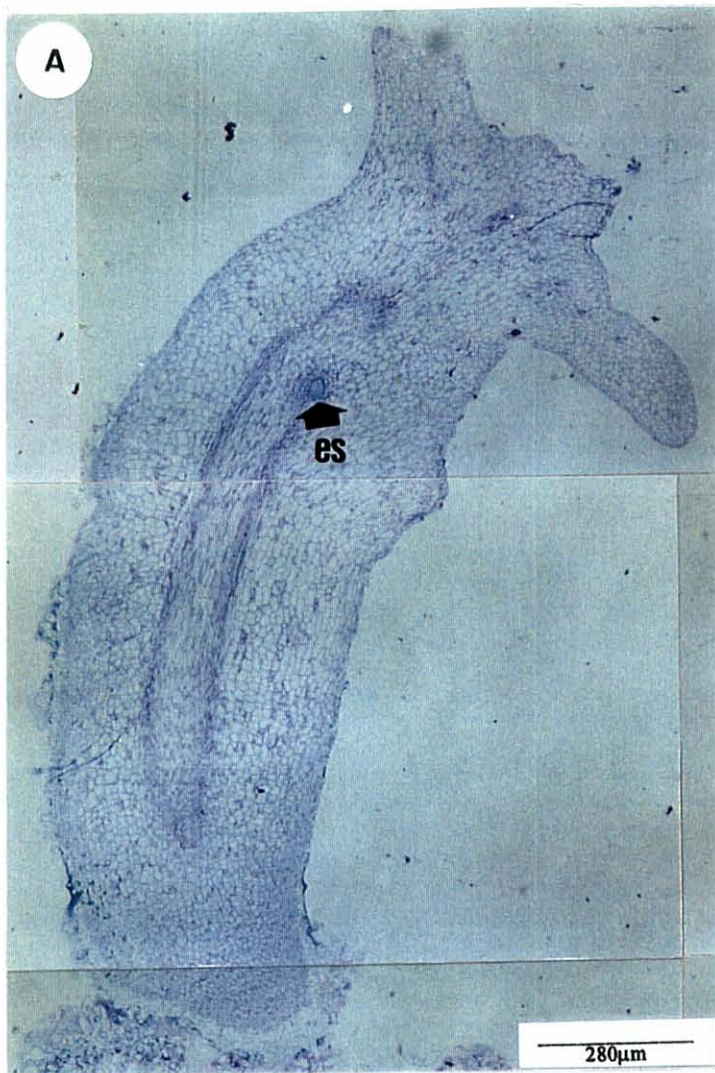


FIGURA 28. A- E B- SECÇÃO TRANSVERSAL MOSTRANDO A FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES A PARTIR DA EPIDERME E CAMADAS SUB-EPIDÉRMICAS; C- E D- SECÇÃO LONGITUDINAL DA FORMAÇÃO DE CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS NA SÚPERFÍCIE DE EMBRIÕES SOMÁTICOS ANORMAIS E CÉLULAS CALOSAS; E- E F- COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS (E) E CÉLULAS CALOSAS (F).

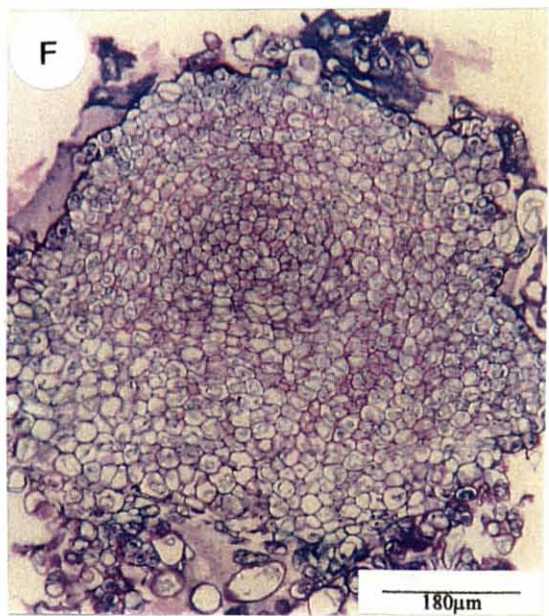
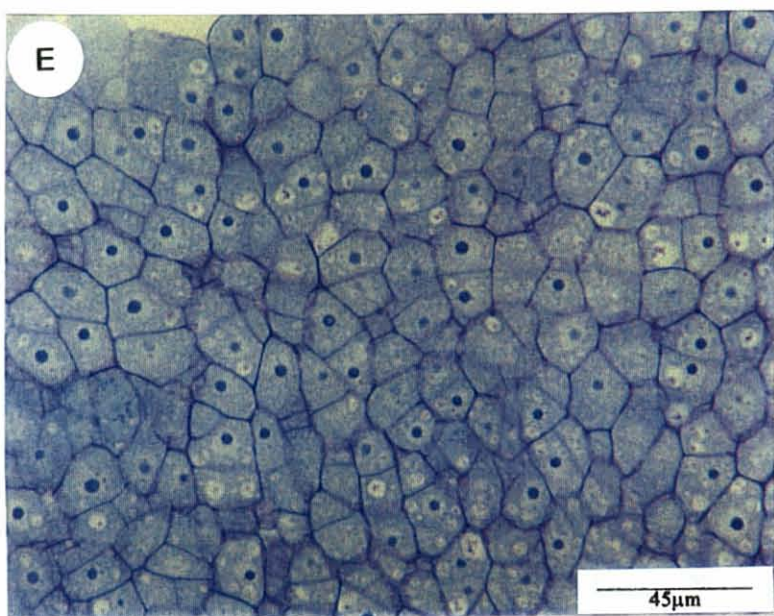
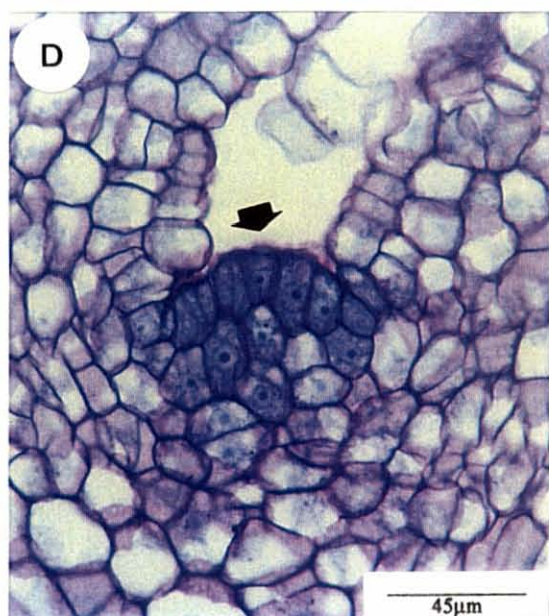
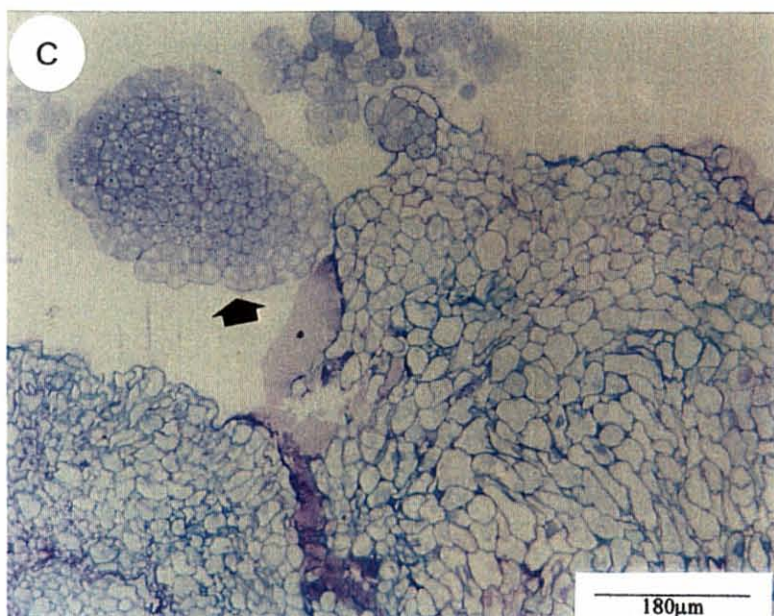
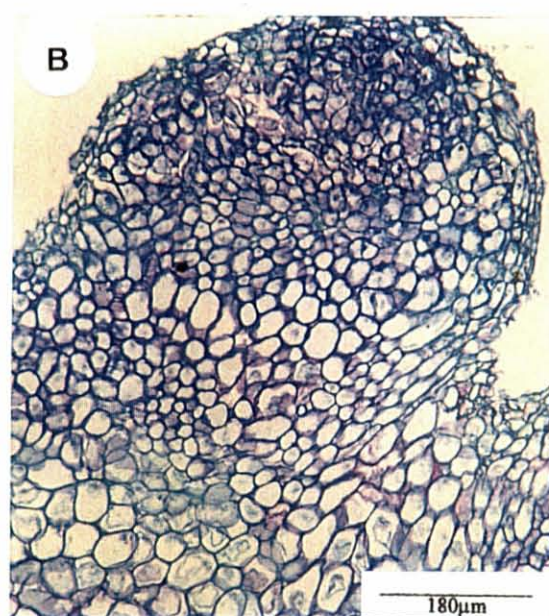


FIGURA 29. A- E B- MASSAS CELULARES UTILIZADAS NOS TESTES CITOQUÍMICOS; A- MASSA CELULAR GRANULOSA E FRIÁVEL PROLIFERANDO EM MEIO DE CULTURA LPm, SUPLEMENTADO COM 1,25 μ M DE 2,4-D E 0,5 μ M DE Cin, APÓS OITO SUBCULTIVOS (1,9X); B- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES EM SUA SUPERFÍCIE, INOCULADA EM MEIO DE CULTURA LPm, ACRESCIDO DE 30 μ M DE ABA (1,25X); C- EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES SE DESENVOLVENDO NA SUPERFÍCIE DA MASSA (B) E CORADOS COM CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS (5X); D- E E- AGLOMERADOS CELULARES FORTEMENTE CORADOS COM CARMIN ACÉTICO; F- CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS, DE TAMANHO PEQUENO (20-30 μ m), ISODIAMÉTRICAS, CORADAS COM CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS (eg= embriões somáticos globulares).

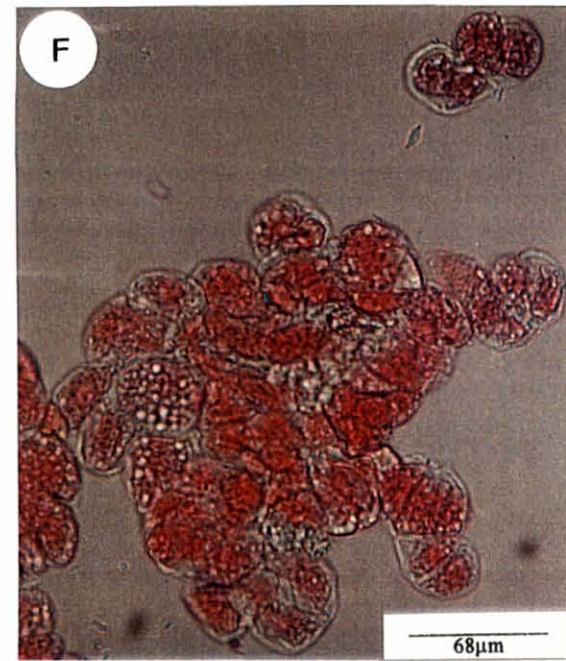
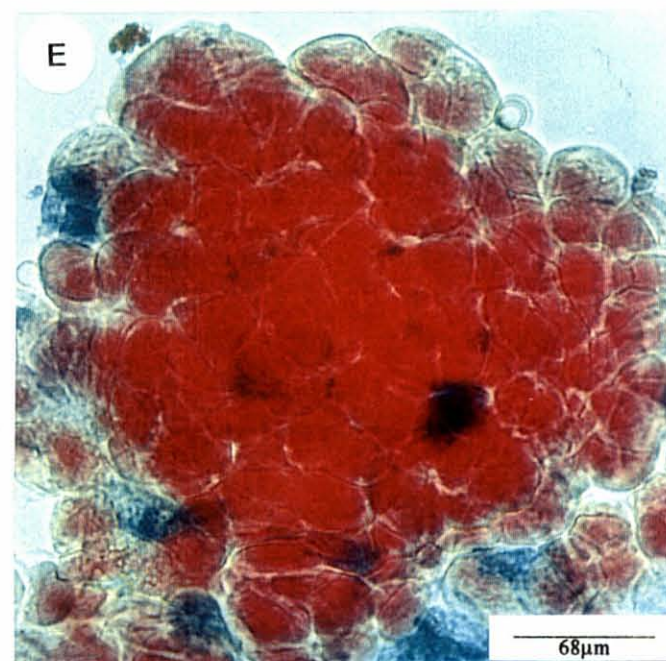
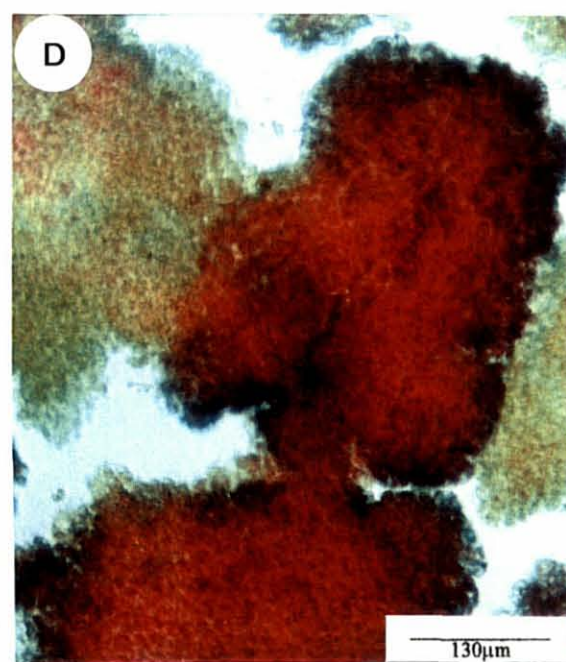
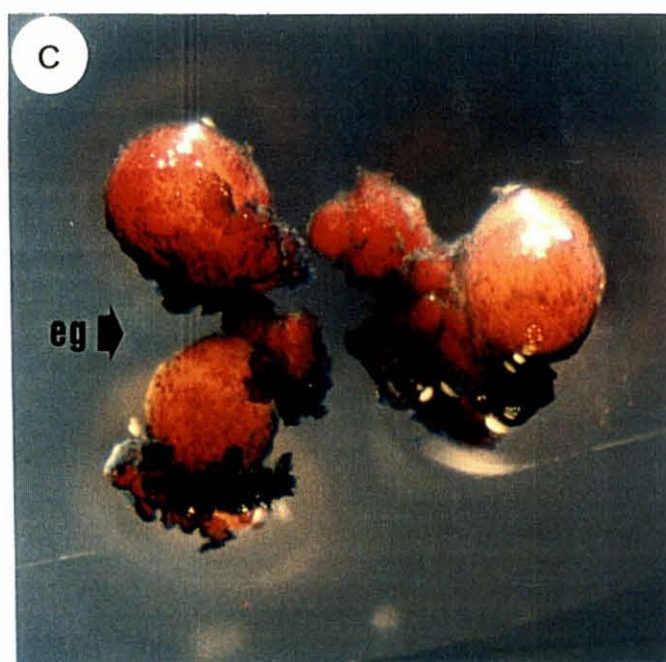
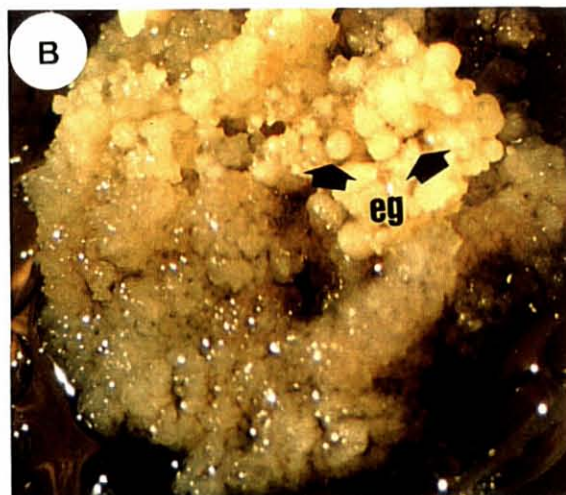
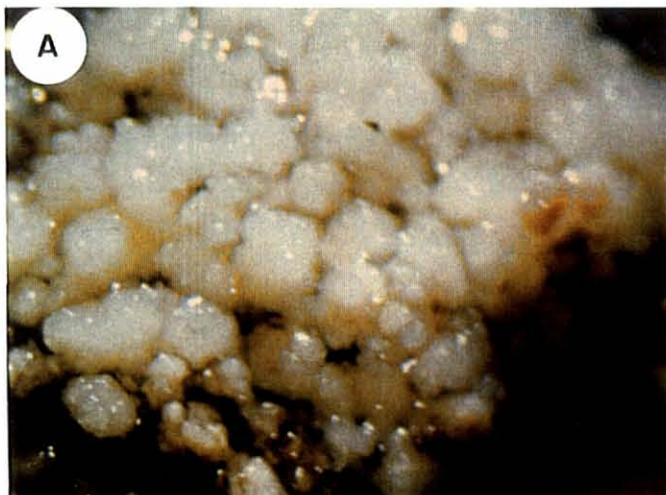
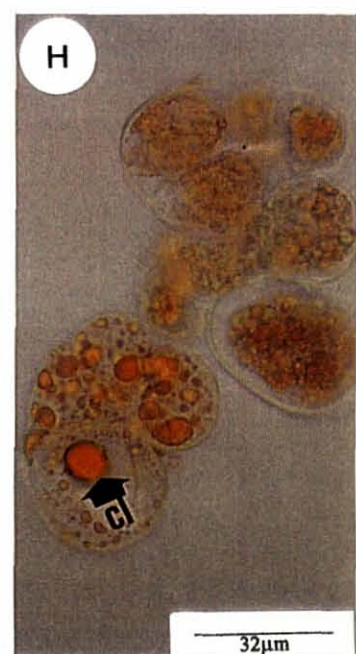
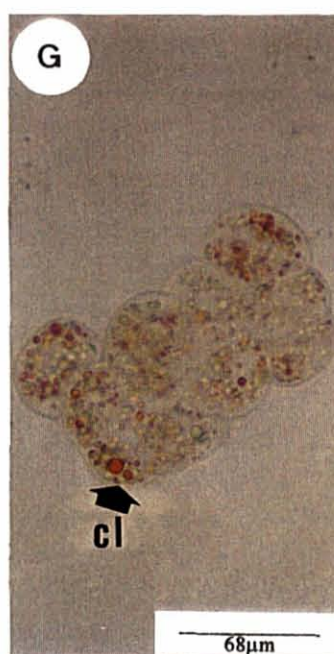
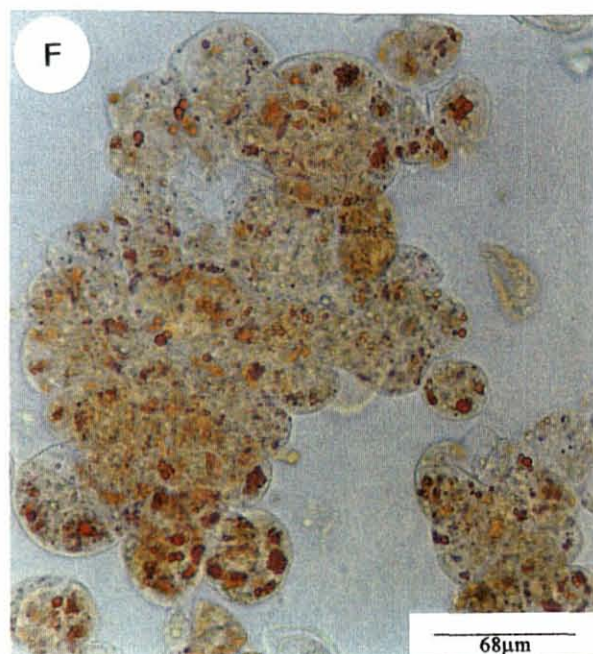
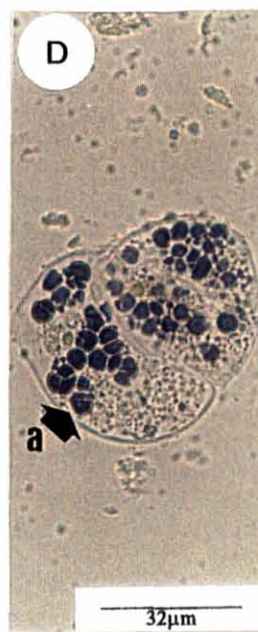
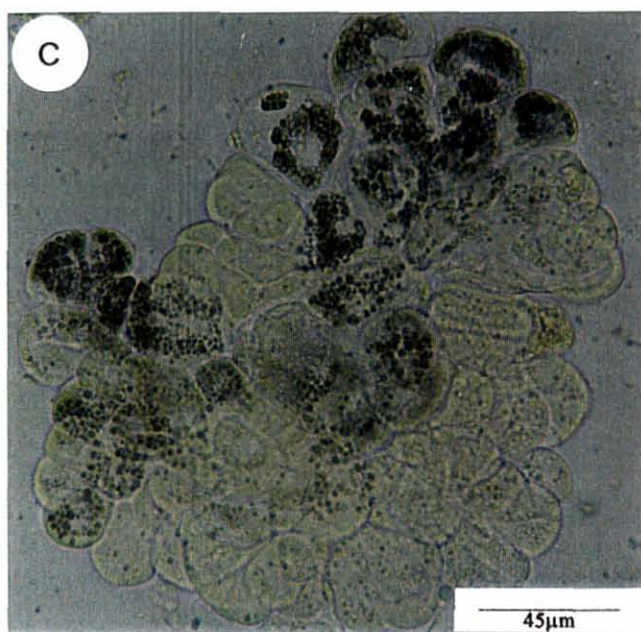
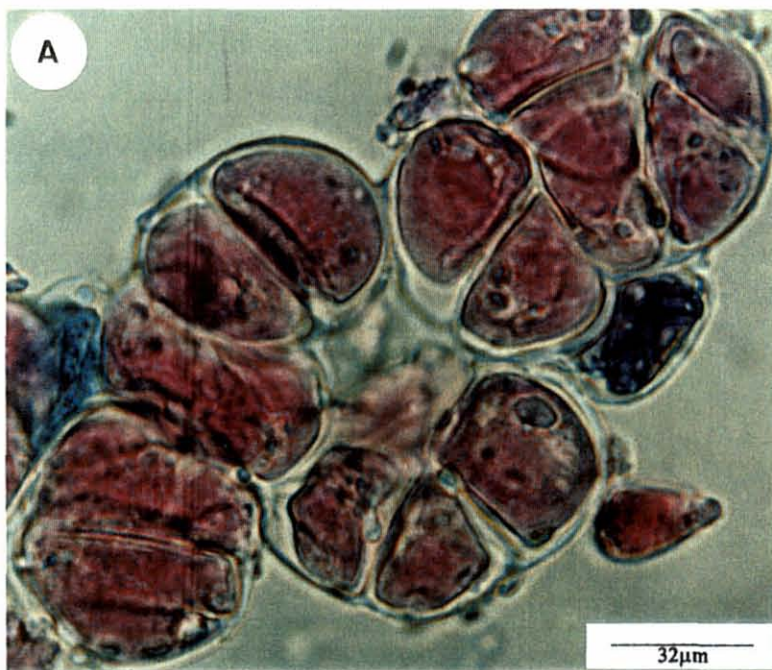


FIGURA 30. A- E B- CÉLULAS EMBRIOGENÉTICAS QUE REAGIRAM FORTEMENTE AO CARMIN ACÉTICO; C-E- CÉLULAS APRESENTANDO GRÃOS DE AMIDO QUE REAGIRAM AO LUGOL; F-H- CÉLULAS CONTENDO CORPOS LIPÍDICOS QUE REAGIRAM AO SUDAM III (a= grãos de amido; cl= corpos lipídicos).



ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA TESTADOS PARA A CULTURA *IN VITRO* DE *A. polyneuron*.

Composição	MS (mg/l)	MS (mM)	LPm (mg/l)	LPm (mM)	WPM (mg/l)	WPM (mM)
macronutrientes						
NH ₄ NO ₃	1650	20,6	1200	15,0	400	5,0
KNO ₃	1900	18,8	1900	19,0	-	5,5
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440	3,0	180	1,2	96	0,65
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	-	556	2,35
KH ₂ PO ₄	170	1,25	340	2,5	170	1,25
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	990	5,68
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370	1,5	370	1,5	370	1,5
micronutrientes						
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	100	19,0	50	37,3	100
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	100	14,0	50	27,8	100
MnSO ₄ . H ₂ O	16,9	100	1,69	10	16,9	100
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6	30	2,88	10	8,6	30
H ₃ BO ₃	6,2	100	0,63	10	6,2	100
KI	0,83	5,0	0,75	4,5	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,1	0,0025	0,01	0,25	1,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,0	0,025	0,1	0,25	1,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,1	0,0025	0,01	-	-
		(μM)		(μM)		(μM)
tiamina – HCl	0,1	0,3	1,0	15,0	10	3,0
piridoxina – HCl	0,5	2,4	0,5	4,9	0,5	2,4
ácido nicotínico	0,5	4,0	0,5	16,0	0,5	4,0
glicina	2,0	27,0	2,0	27,0	2,0	27,0
mio-inositol	100	0,555	100	0,555	100	0,555
sacarose	30000	100	30000	100	30000	100

MS=MURASHIGE e SKOOG,1962; LPm = VON ARNOLD E ERIKSSON, 1981;WPM= LLOYD e MC COWN, 1980.

ANEXO 2. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO NaOCl NA DESINFESTAÇÃO DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron*, REALIZADA NO VERÃO E OUTONO DE 1992.

Causas da variação	G.L.	Q.M.			
		Necrose (%)	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Sobrevivência (%)
A: concentração	1	0,8027	0,3546	16,5654**	0,9710
B: tempo	1	0,0566	0,9869	1,4979	0,9249
C: época	1	1,0351	4,7597	12,6940**	0,6181
concentração x tempo	1	11,0637 **	0,1870	0,1925	3,6019**
concentração x época	1	2,7717	2,5231	0,1018	1,3642
tempo x época	1	0,2109	0,0265	0,3237	0,0425
concentração x tempo x época	1	0,2579	1,3519	0,9710	1,5487
resíduo	32	1,3601	1,6441	1,0655	0,5540
total	39				
C.V. (%)		32,65	31,63	44,67	9,45

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 3. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO HgCl₂ NA DESINFESTAÇÃO DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron*, REALIZADA NO INVERNO E NA PRIMAVERA DE 1992

Causas da variação	G.L.	Q.M.			
		Necrose (%)	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Sobrevivência (%)
A: concentração	2	1,1422	4,5665*	3,1215*	1,2489**
B: tempo	1	1,2294	3,8362	0,7287	0,0706
C: época	1	0,1219	5,0737*	0,0877	0,4412
concentração x tempo	2	8,9290 **	0,2594	2,9514*	1,1970**
concentração x época	2	0,1057	0,5983	0,6463	0,0055
tempo x época	1	0,1782	5,1024*	0,3074	0,4190
concentração x tempo x época	2	0,2206	0,4255	1,4305	0,1547
resíduo	48	1,4167	1,0460	0,8391	0,2089
total	59				
C.V. (%)		40,19	45,43	54,59	9,02

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 4. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO $HgCl_2$ NA DESINFESTAÇÃO DE BROTAÇÕES APICAIS DE *A. polyneuron*, REALIZADA DURANTE AS ESTAÇÕES DO ANO DE 1993.

Causas da variação	G.L.	Q.M.			
		Necrose (%)	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Sobrevivência (%)
A: concentração	2	0,7300	17,7805**	3,7864*	3,8506**
B: tempo	1	4,1566*	1,7247	4,5412*	0,1639
C: época	3	10,6454**	12,1148**	4,3429**	5,4134**
concentração x tempo	2	2,1019	3,1706	3,6776*	0,4464
concentração x época	6	0,2339	3,1019*	1,0418	0,6308*
tempo x época	3	2,4584*	1,1985	0,9508	0,2707
concentração x tempo x época	6	0,8610	1,1043	0,7402	0,1314
resíduo	72	0,9063	1,2932	1,0565	0,2289
total	95				
C.V. (%)		26,99	39,66	52,89	8,51

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 5. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE FITORREGULADORES SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.		
		Cultivo inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2
A: fitorregulador	2	1,1426**	3,0467**	5,0543**
B: concentração	3	5,4181**	14,2746**	22,3906**
fitorregulador x concentração	6	0,4574**	1,7239**	1,6682**
resíduo	60	0,0301	0,0316	0,0449
total	71			
C.V. (%)		8,03%	6,70%	6,70

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 6. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.		
		Cultivo inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2
A: combinações de fitorreguladores	2	0,7222**	1,0555	0,1667
resíduo	15	0,1444	0,3222	0,4111
total	17			
C.V. (%)		16,68%	18,58%	18,32

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 7. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES, SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES REGENERADAS, EM EXPLANTES DO EPICÓTILO DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.			
		Cultivo inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
A:BAP	3	0,0005	0,0193	11,9887**	152,2880**
B:AIB ou ANA	2	0,0005	0,0005	0,0350	0,6717
BAP x AIB ou ANA	6	0,0005	0,0265	0,0631	0,2546
resíduo	60	0,0005	0,0127	0,0650	0,2323
total	71				
C.V. (%)		2,35	10,78	15,53	14,57

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 8. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES, SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES REGENERADAS, EM EXPLANTES DO HIPOCÓTILO DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.			
		Cultivo inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
A:BAP	3	0,5404**	4,2649**	26,6804**	138,4494**
B: AIB ou ANA	2	0,0429	0,0450	0,9520**	2,0204**
BAP x AIB ou ANA	6	0,0212	0,0978	0,1606	1,4765**
resíduo	60	0,0231	0,0640	0,1331	0,2056
total	71				
C.V. (%)		13,26	16,66	15,33	12,61

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 9. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB E DO TEMPO DE TRATAMENTO SOBRE O ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
A: concentração	1	672,4372*
B: tempo	3	5498,4385**
concentração x tempo	3	290,7673*
resíduo	24	94,4305
total	31	

C.V. = 37,92%

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 10. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB (pH AJUSTADO EM 5,6) E DO TEMPO DE TRATAMENTO SOBRE O ENRAIZAMENTO (%) DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
A: concentração	2	2068,8129**
B: tempo	1	979,7165*
concentração x tempo	2	79,6224
resíduo	18	151,2523
total	23	

C.V. = 21,60 %

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 11. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DOS TRATAMENTOS PULSOS COM SOLUÇÕES DE AIB E DAS REGIÕES DE ORIGEM DAS BROTAÇÕES (EPICÓTILO E HIPOCÓTILO) SOBRE O ENRAIZAMENTO (%) DE *A. polyneuron*.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
A: região	1	14,8870*
B: concentração	3	3376,0719**
região x concentração	3	16,7844**
resíduo	16	2,1449
total	23	

C.V. = 4,64 %

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 12. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE SOBRE O ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE *A. polyneuron*, ORIGINADAS DO EPICÓTILO E HIPOCÓTILO E SUBMETIDAS A TRATAMENTO PULSO COM 10 mM DE AIB, 15 MINUTOS.

Causa da variação	Epicótilo			Hipocótilo		
	G.L.	Q.M.		G.L.	Q.M.	
		%	nº de raízes		%	nº de raízes
A: condições	2	156,2500	0,0083	2	103,6741	0,0205
resíduo	9	106,0895	0,0267	6	128,4420	0,0233
total	11			8		
C.V. (%)		18,31	13,88		15,94	11,78

ns= não significativo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AHUJA, M. R. **Micropropagation à la carte**. In: _____. Micropropagation of woody plants. Dordrecht: Kluwer, 1993. p. 1-8.
- 2 ALEMANN, L.; BERTHOLY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, Rockville, v. 33, p. 163-172, 1997.
- 3 _____. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 46, p. 187-194, 1996.
- 4 AMMIRATO, P. V. Organizational events during somatic embryogenesis. In: GREEN, C. E.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. (Eds.) **Plant tissue and cell culture**, New York: Alan R. Liss, 1987. p.57-81.
- 5 AMMIRATO, P. V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 9-31.
- 6 ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – Induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, Brasília, v. 10, n.2, p.113-118, 1998.
- 7 ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 35, p.1-35, 1993.
- 8 AUER, C. A.; COHEN, J. D.; LALOUE, M.; COOKE, T. J. Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 98, p. 1035-1041, 1992.
- 9 BADJI, S.; MAIRONE, Y.; NDIAYE, T.; MERLIN, G.; DANTHU, P.; NEVILLE, P.; COLONNA, J. P. *In vitro* propagation of the gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd.). 1- Developing a rapid method for producing plants. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v.12, p. 629-633, 1993.
- 10 BAJAJ, Y. P. S. Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. In: _____. (Ed.). **Bitotechnology in agriculture and forestry 30: somatic embryogenesis and synthetic seed I**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 105-119.
- 11 BAKER, H.G. Apomixis and polyembryony in *Pachia oleaginea* (Bombacaceae). **Amer. J. Bot.**, v. 47, p. 296-302, 1960.
- 12 BARCIELA, J.; VIEITEZ, A. M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. **Ann. Bot.**, London, v. 71, p. 395-404, 1993.
- 13 BARENDSE, G. W. M.; PEETERS, T. J. M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Bot. Neerl.**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 3-17, 1995.

- 14 BATES, S.; PREECE, J. E.; NAVARRETE, N.E.; SAMBEEK, J.W.; GAFFNEY, G.R. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v.31, p. 21-29, 1992.
- 15 BENNETT, L. K.; DAVIES JR., F. T. *In Vitro* Propagation of *Quercus shumardii* seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v.21, n.4, p. 1045-1047, 1986.
- 16 BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A.; TONKIN, C. M.; McDAVID, D. A. J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Ann. Bot.**, London, v. 74, p. 53-58, 1994.
- 17 BONGA, J. M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987. p. 249-271.
- 18 BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v. 106, n.4, p. 515-518, 1981.
- 19 BRAND, M. H.; LINEBERGER, R. D. *In vitro* propagation of *Halesia carolina* L. and the influence of explantation time on initial shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 103-113, 1986.
- 20 BRUNE, A.; MELCHIOR, G. H. Ecological and genetical factors affecting exploitation and conservation of forests in Brazil and Venezuela. In: BURLEY, J.; STYLES, B. T. **Tropical trees: variation, breeding and conservation**. New York: Academic, 1976. p. 203-215.
- 21 BUCHEIM, J. A.; COLBURN, S. M.; RANCH, J. P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.89, p.768-775, 1989.
- 22 BURNS, J. A.; WETZSTEIN, H. Y. Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v.48, p. 93-102, 1997.
- 23 CAILLOUX, F.; JULIEN-GUERRIER, J.; LINOSSIER, L.; COUDRET, A. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **Plant Sci.**, Limerick, v. 120, p. 185-196, 1996.
- 24 CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Protoplasma**, Viena, v. 191, p. 35-45, 1996.
- 25 CARIMI, F.; DI LORENZO, R.; CRESCIMANNO, F. G. Callus induction and somatic embryogenesis in carob (*Ceratonia siliqua* L.) from ovule culture. **Sci. Hortic.**, Amsterdam, v. 70, p. 73-79, 1997.
- 26 CARMAN, J.G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. **In Vitro Cell & Dev. Biol.**, Rockville, v.26, p.746-753, 1990.
- 27 CARRIER, D. J.; CUNNINGHAM, J. E.; TAYLOR, D. C. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 16, p. 550-554, 1997.

- 28 CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994.
- 29 CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 224-246.
- 30 _____. Micropropagation of Hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and Ash. (*Fraxinus excelsior* L.). **Biol. Plant.**, Prague, v. 32, n.5, p. 332-338, 1990.
- 31 _____. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 9, p. 398-401, 1990.
- 32 CHOI, Y. E.; SOH, W. Y. Origin and early developmental patterns of somatic embryo from freely suspended single cells in cell culture of celery (*Apium graveolens* L.). **Phytomorphology**, Delhi, v. 47, n. 1, p. 107-117, 1997.
- 33 CHRISTIANSON, M. L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLANDER, A.; WILSON, C. M. **Tissue culture in forestry and agriculture.** New York: Plenum Press, 1985. p. 83-104.
- 34 _____. Casual events in morphogenesis. In: GREEN, C. F.; SOMMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. **Plant Tissue and Cell Culture.** New York: Allan Liss., 1987. p. 45-55.
- 35 CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 112, p. 494-497, 1985.
- 36 COPELAND, H. F. Morphology and embryology of *Euonymus japonica*. **Phytomorphology**, Dehli, v.16, p. 326-334, 1966.
- 37 DAL VESCO, L. L. **Indução e controle da embriogênese somática in vitro na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.).** Florianópolis, 1998. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, 108 p.
- 38 DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Sci. Hortic.**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.
- 39 DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 1-13.
- 40 DECLERCK, V.; KORBAN, S. S. Effects of source macronutrients and plant growth regulator concentrations on shoot proliferation of *Cornus florida*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 38, n.1, p.57-60, 1994.
- 41 DE JONG, A. J.; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v. 22, p. 367-377, 1993.
- 42 DE KLERK, G. J.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; LIEBEREI, R. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 1, p. 53-66, 1997.

- 43 DELBREIL, B.; GOEBEL-TOURAND, I.; LEFRANÇOIS, C.; JULLIEN, M. Isolation and characterization of long-term embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L. **J. Plant Physiol.**, v. 144, p. 194-200, 1994.
- 44 DENG, M. D.; CORNU, D. Maturation and germination of walnut somatic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 28, p. 195-202, 1992.
- 45 DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. **Journal Exp. Bot.**, Oxford, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.
- 46 DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. **Hortscience**, Alexandria, v. 19, p. 507-509, 1984.
- 47 DUNSTAN, D. I.; TAUTORUS, T. E.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. In: THORPE, T.A. (Ed.). ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 471-538.
- 48 DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnol. & Genet. Eng. Rev**, England, v. 6, p. 341-378, 1988.
- 49 DURZAN, D. J.; CAMPBELL, R. A. Prospects for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture. **Can. J. For. Res.**, Ottawa, Canada, v. 4, n. 2, p.152-174., 1974.
- 50 EL MAÂTAOUI, M.; ESPAGNAC, H.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of callogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. **Ann. Bot.**, London, v. 66, p. 183-190, 1990.
- 51 ELLIS, D. D.; BARCZYNSKA, B. H.; McCOWN, B. H.; NELSON, N. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 27, p. 281-287, 1991.
- 52 EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Bot. Neerl.**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1-4, 1994.
- 53 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná**. Brasília: CNPH, 1986. 89 p.
- 54 EVANS, D. A. ; SHARP, W. R.; FLICK, C. E. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T. A. **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 45-113.
- 55 FAURE, O. Embryons somatiques de *Vitis rupestris* et embryons zygotiques de *Vitis* sp: morphologie, histologie, histochimie et développement. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 68, p. 2305-2315, 1989.
- 56 FAURE, O.; AARROUF, J.; NOUGARÈDE, A. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): embryonic organogenesis. **Ann. Bot.**, London, v. 78, p. 29-37, 1996.
- 57 FAURE, O.; DEWITTE, W.; NOUGARÈDE, A.; ONCKELEN, H. V. Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts. **Physiol. Plant**, Copenhagen, v. 102, p. 591-595, 1998.

- 58 FELLMAN, C. D.; READ, P. E.; HOSIER, M. A. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1197-1200, 1987.
- 59 FINER, J. J. Direct somatic embryogenesis. In: GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. (Eds). **Plant cell tissue and organ cult.:** fundamental methods. Berlin: Springer-Verlag, 1995.
- 60 FIRN, R. D. Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 67, p. 267-272, 1986.
- 61 FRANÇA, S. C.; DUARTE, I. B.; MORAES, R. M.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 42, p. 291-293, 1995.
- 62 FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 69, p. 26-33, 1991.
- 63 FUNDAÇÃO S.O.S MATA ATLÂNTICA/INPE/ISA. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995.** São Paulo: Fundação S.O.S. Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Instituto Socioambiental, 1998. 54p.
- 64 GARIN, E.; GRENIER, E.; DEMARCH, G. G. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 83-91, 1997.
- 65 GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology.** Great Britain: Exegetics Limited, 1993. v. 1 574 p.
- 66 _____. **Plant propagation by tissue culture: in practice.** Great Britain: Exegetics Limited, 1996. v. 2. 1361p.
- 67 GINGAS, V. M.; LINEBERGER, R. D. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 17, p. 191-203, 1989.
- 68 GIULEVA, V.; ATTANASOV, A. Micropropagation of *Platanus acerifolia* in vitro. **Silvae Genet.**, Frankfurt, v. 43, n. 4, p. 215-218, 1994.
- 69 GRAY, D. J.; COMPTON, M. E.; HARREL, R. C. Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry 30: somatic embryogenesis and synthetic seed I.** New York: Springer-Verlag, 1995. p. 126-145.
- 70 GRAY, D. J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Rev. in Plant Sci.**, v. 10, n. 1, p. 33-61, 1991.
- 71 GRESSHOFF, P. M.; DOY, C. H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Planta**, Heidelberg, v. 107, p. 161-170, 1972.
- 72 GREY, D. J.; STEPAN-SARKISSIAN, G.; FOWLER, M. W. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**, v. 2. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 31-60.

- 73 GROSSNICKLES, S. C.; CYR, D.; POLONENKO, D. R. Somatic embryogenesis tissue culture for the propagation of conifer seedlings: a technology comes of age. **Tree Planters' Notes**, Mora, v. 47, n. 2, p. 48-57, 1996.
- 74 GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. São Paulo, 1989. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Botânica). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- 75 GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **J. Plant Res.**, Tokyo, v. 111, p. 65-71, 1998.
- 76 GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Técnicas e aplicações da biologia celular e molecular em plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1999. p. 533-568.
- 77 GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T. Embriogênese somática e sementes sintéticas. **ABCTP Not.**, Brasília, n. 32, p. 2-9, 1998.
- 78 GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **Biotechnol.**, Oxford, v. 5, p. 147-151, 1987.
- 79 GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; CARLSON, W. C. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In: SOH, W. Y.; LIU, J. R.; KOMAMINE, A. **Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants**. Korean Soc. Plant Tissue Culture, 1993, p.18-37.
- 80 GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; PULLMAN, G.; YANCEY, M.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; CARPENTER, C. Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees. In: VASIL, I. K. **Scale-up and automation in plant propagation**. California: Academic Press, 1991. p. 75-93.
- 81 GURGEL FILHO, O. do A.; MOREAS, J. L.; GARRIDO, L. M. do A. G. Silvicultura de essências indígenas sob povoamentos homóclitos coetâneos experimentais. VIII. peroba-rosa. (*Aspidosperma polyneuron* M. Arg.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. **Anais. Silvicultura em São Paulo**, v. 16 A, n. 2, p. 878-883, 1982.
- 82 HACCIIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, Dehli, v. 28, p. 74-81, 1978.
- 83 HALPERIN, W. *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 1-14.
- 84 HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. Ontogeny of adventice embryos on wild carrot. **Science**, Washington, v. 147, p. 756-758, 1965.
- 85 HANDLEY, L. W. Future uses of somatic embryogenesis in woody plantation species. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 415-434.

- 86 HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 539-560.
- 87 _____. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. **Bot. Gaz.**, Chicago, v. 152, n. 4, p. 446-452, 1991.
- 88 HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. Principles of tissue culture for micropropagation. In: _____. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p. 549-589.
- 89 HATSCHBACH, G. G.; ZILLER, S. R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado de Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ, 1995. 139 p.
- 90 HERMAN, E.B. New plant tissue culture and techniques. In: _____. **Recent advances in plant tissue culture V – New techniques and systems for growth, regeneration and micropropagation 1995-1997**. USA: Agritech Consultants, 1997. p. 1-18.
- 91 HICKS, G. S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Rev**, v. 46, n. 1, p.1-23, 1980.
- 92 HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- 93 HRISTOFOROGLU, K.; SCHMIDT, J.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 40, p. 277-284, 1995.
- 94 HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publishing Company, 1983. v.1, p. 177-227.
- 95 HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 33, p. 105-109, 1993.
- 96 HUTCHINSON, J. F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple "Northern Spy". **Sci. Hortic.**, Amsterdam, v. 22, p. 189-194, 1984.
- 97 INOUE, M. T.; RODERJAN, C.V.; KUNYOSHI, Y. S. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba: FUPEF, 1984.
- 98 JAIN, A. K.; NESSLER, C. L. Clonal propagation of *Camptotheca acuminata* through shoot bud culture. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 44, p. 229-233, 1996.
- 99 JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.
- 100 JORDAN, M.; VELOZO, J.; SABTA, A. M. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v.44, p. 189-194, 1996.
- 101 KAGEYAMA, P. Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas. **Ipef**, Piracicaba, n. 35, p. 7-39, 1987.

- 102 KAGEYAMA, P. Y. ; DIAS, I. S. Aplicação da genética em espécies florestais nativas. In: Congresso Nacional sobre Essências Nativas. **Anais.** Campos do Jordão: Silvicultura em S. Paulo, 1982. p. 782-791.
- 103 KAMADA, H.; HARADA, H. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of Amino Acids and Inorganic Nitrogenous Compounds on Somatic Embryogenesis. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 91, p. 453-463, 1979.
- 104 KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde- glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of cell biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- 105 KATO, M. Somatic embryogenesis from immature leaves of *in vitro* grown tea shoots. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 920-923, 1996.
- 106 KAWAHARA, R. ; KOMAMINE, A. . Molecular basis of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 30: somatic embryogenesis and synthetic seed I.** New York: Springer-Verlag, 1995. p. 30-39.
- 107 KHLIFI, S.; TREMBLAY, F. M. Maturation of black spruce somatic embryos. Part. I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.**, Dordrecht, v. 41, p. 23-32, 1995.
- 108 KISS, J.; HESZKY, L. E.; KISS, E.; GYULAI, G. High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 30, p. 59-64, 1992.
- 109 KIYOSUE, T.; SATOH, S.; KAMADA, H.; HARADA, H. Somatic embryogenesis in higher plants. **J. Plant Res.**, Tokyo, v. 3, p. 75-82, 1993.
- 110 KONG, L.; YEUNG, E. C. Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 93, p. 298-304, 1995.
- 111 KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 774-796.
- 112 LAKSHMANAN, P.; N. G., S. K.; LOH, C. S.; GOH, C. J. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured *in vitro*. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v. 38, n. 1, p. 59-64, 1997.
- 113 LAMBARDI, M.; SHARMA, K. K.; THORPE, T. A. *In vitro* regeneration of shoot buds and plantlet formation from mature embryos of *Pinus halepensis* Mill. **Acta Hort.**, Wageningen, v. 289, p. 123-124, 1991.
- 114 LAMBÉ, P.; MUTAMBEL, H. S. N.; FOUCHÉ, J. G.; DELTOUR, R.; FOIDART, J. M.; GASPAR, T. DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, v. 33, p. 155-162, 1997.

- 115 LATHA, P. G.; SEENI, S. Multiplication of the endangered Indian Pitcher plant (*Nepenthes klariana*) through enhanced axillary branching *in vitro*. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 69-71, 1994.
- 116 LEE, K. S.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; BRUNNER, H.; AFZA, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 51, p. 1-8, 1997.
- 117 LETHAM, D. S.; PALMI, L. M. S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, Palo Alto, v. 34, p. 163-197, 1983.
- 118 LIBBENGA, K. R.; MENNES, A. M. Hormone binding and signal transduction. In: DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 272-297.
- 119 LINOSSIER, L.; VEISSEIRE, P.; CAILLOUX, F.; COUDRET, A. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. **Plant Sci.**, Limerick, v. 124, p. 183-191, 1997.
- 120 LITZ, R. E. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; COSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 179-193.
- 121 LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World J. Microbiol. & Biotechnol.**, Oxford, v. 11, p. 416-425, 1995.
- 122 LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneración de plantas em el cultivo de tejidos: embriogenenesis somática y organogénesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed). **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Colombia: CIAT, 1991. p. 143-172.
- 123 LIU, C. M.; XU, Z.; CHUA, N. H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, p. 621-630, 1993.
- 124 LLOYD, G. ; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Comb. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- 125 LO SCHIAVO, F. Early events in embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 30: somatic embryogenesis and synthetic seed I**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 20-28.
- 126 LO SCHIAVO, P. L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hipomethylating drugs. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v. 77, p. 325-331, 1989.
- 127 LU, C.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (guinea grass). **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 72, n. 12, p. 1908-1913, 1985.
- 128 MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G.A. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 43, p. 295-299, 1995.

- 129 MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E. G. Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium rapens in vitro*. **Ann. Bot.**, London, v. 56, p. 619-630, 1985.
- 130 MANZANERA, J. A.; ASTORGA, R.; BUENO, M. A. Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. **Silvae Genet.**, Frankfurt, v. 42, n. 2-3, p. 90-93, 1993.
- 131 MATSUTA, N.; HIRABAYASHI, T. Embryogenic cell lines from somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 7, p. 684-687, 1989.
- 132 MEIER, K.; REUTHER, G. Factors controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 39, p. 231-238, 1994.
- 133 MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.
- 134 MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; WILLIAMS, E. G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: BHOJWANI, S. S. (Ed.) **Plant tissue culture: applications and limitations**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 67-101.
- 135 MERKLE, S. A.; WIECKO, A. T.; WATSON-PAULEY, B. A. Somatic embryogenesis in American chestnut. **Can. J. For. Res.**, Ottawa, v. 21, n.11, p. 1698-1701, 1991.
- 136 MERKLE, S. A.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Somatic embryogenesis in tissue cultures of pecan. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, p. 128-130, 1987.
- 137 MEZZETTI, B.; MINOTTA, G.; NAVACCHI, O.; ROSATI, P. *In vitro* propagation of *Ulmus carpinifolia*. **Acta Hort.**, Wageningen, v. 227, p. 396-398, 1988.
- 138 MINOCHA, S. C.; MINOCHA, R. Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 9-22.
- 139 MISRA, S. Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis and seed germination: biochemical and molecular advances . **Seed Sci. Res.**, v. 4, p. 357-384, 1994.
- 140 _____. Molecular analysis of zygotic and somatic conifer embryos. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants: history, molecular and biochemical aspects and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.119-142.
- 141 MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S. A.; SCHNELL, R. J.; SPLITTSTOESSER, W. E. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 14, p. 525-528, 1995.
- 142 MOK, H. C.; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E.; HUJER, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin –active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p.1194-1197, 1987.
- 143 MOURA, I.; CARNEIRO, M. F. N. *In vitro* culture of immature embryos of *Hovea forsteriana* Becc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, p. 207-209, 1992.

- 144 MURALIDHARAN, E. M.; GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 8, p. 41-43, 1989.
- 145 MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (eds.) **Somatic embryogenesis in woody plants**, Angiosperms. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. v.2. p. 24-40.
- 146 MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.
- 147 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- 148 MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiol. Plant**, Copenhagen, v. 94, n.2, p. 268-276, 1995.
- 149 NEUMAN, M. C.; PREECE, J. E.; VAN SAMBEEK, J. W.; GAFFNEY, G. R. Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 32, p. 9-18, 1993.
- 150 NICCOL, R. J.; REGAN, P. A.; DE FILIPPIS, L. F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Aust. For.**, Canberra, v. 57, n. 4, p. 143-147, 1994.
- 151 NICKLE, T. C.; YEUNG, E. C. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 80, n. 11, p. 1284-1291, 1993.
- 152 NIELSEN, J. M.; BRANDT, K.; HANSEN, J. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benzyladenine, kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 35, p. 173-179, 1993.
- 153 NOGUEIRA, J. C. B.; SIQUEIRA, A. C. M. F. Plantio de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg.) de duas procedências para estudo comparativo. **Silvicultura S. Paulo**, São Paulo, v. 10, p. 61-63, 1976.
- 154 NORGAARD, J. V.; KROGSTROP, P. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* L. K. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 9, n. 9, p. 509-513, 1991.
- 155 NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 100, p. 431-442, 1997.
- 156 OKKELS, F. T. A theory explaining formation of somatic embryogenic cells by auxin induced inhibition of DNA-methylation. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 73, Abst. 4.8, 1988.
- 157 PARROT, W. A.; BAILEY, M. A. Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfafa on auxin-free medium. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 32, p. 69-76, 1993.

- 158 PARROT, W. A.; MERKLE, S. A.; WILLIAMS, E. G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D. R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood., 1991. p. 158-200.
- 159 PASZTOR, Y. P. C. Métodos usados na colheita de sementes. **Silvic. São Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 305-323, 1963.
- 160 PATNAIK, J.; DEBATA, B. K. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. through axillary bud culture. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 427-430, 1996.
- 161 PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. syn. *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p.841-845, 1996.
- 162 PAULA, S. R. de **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e comparação das folhas de plantas *in vitro* com as originadas em casa de vegetação**. Curitiba, 1992. Tese (Mestrado em Botânica) Universidade Federal do Paraná. 74p.
- 163 PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao in vitro*. **Z. Pflanzenphysiol.**, Stuttgart-Hohenheim, v.98, p. 1-4, 1980.
- 164 PEREIRA, A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 42, p. 295-297, 1995.
- 165 PEREZ, C.; POSTIGO, P. Micropropagation of *Betula celtiberica*. **Ann. Bot.**, London, v. 64, p. 67-69, 1989.
- 166 PEREZ-PARRON, M. A.; GONZALEZ-BENITO, M. E.; PEREZ, C. Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 37, p. 297-302, 1994.
- 167 PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; PESCHKE, V. M. Do we understand somaclonal variation? In: NIJKAMP, H. J. J. **Progress in plant cellular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p. 131-141.
- 168 PINA-RODRIGUEZ, F. C. M.; AGUIAR, I. B. Maturação e dispersão de sementes. In: AGUIAR, I. B.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 215-224.
- 169 PLATA, E. BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. **In Vitro Cell. & Dev. Biol.**, Rockville, v. 27, p. 183-189, 1991.
- 170 PRAKASH, S. N.; PENJAL, D.; BHALLA-SARIN, N. Regeneration of pigeonpea (*Cajanus cajan*) from cotyledonary node via multiple shoot formation. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 13, n. 11, p. 623-627, 1994.
- 171 PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant regulators? **Plant Tissue Cult. Biotechnol.**, v. 1, n. 1, p. 26-36, 1995.

- 172 _____. Practical regulation of woody plant growth and development using biotechnology. **Acta Hort.**, Wageningen, v. 300, p. 23-33, 1991.
- 173 PREECE, J. E.; HUETTEMAN, C. A.; ASHBY, W. C. Micro- and cutting propagation of silver maple I. Results with adult and juvenile propagules. **J. Amer.Soc. Hort.Sci.**, Alexandria, v. 116, n. 1, p. 142-148, 1991.
- 174 PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERNAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.71-93.
- 175 PROFUMO, P.; GASTALDO, P.; RASCIO, N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**, v. 138, p.89-97, 1987.
- 176 PUDDPHAT, I. J.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, N. A. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. **J. Exp. Bot.**, v. 48, n. 309, p. 951-962, 1997.
- 177 PUROHIT, S. D.; DAVE, A. Micropropagation of *Sterculia urens* Roxb.- an endangered tree species. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 704-706, 1996.
- 178 PUROHIT, S. D.; KUKDA, G. *In vitro* propagation of *Wrightia tinctoria*. **Biol. Plant.**, Prague. v. 36, n. 4, p. 519-526, 1994.
- 179 PUROHIT, S. D.; KUKDA, G.; SHARMA, P.; TAK, K. *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia tomentosa* through enhanced axillary branching. **Plant Sci.**, Limerick, v. 103, p. 67-72, 1994.
- 180 QUINN, J.; SIMON, J. E.; JANICK, J. Histology of zygotic and somatic embryogenesis in borage. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v. 114, n. 3, p. 516-520, 1989.
- 181 QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. **Acta Hort.**, Wageningen, v. 78, p. 437-442, 1977.
- 182 QURASHI, A. ; KOCH, V.; MISHRA, S. K. *In vitro* micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v.45, p. 87-91, 1996.
- 183 RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 81, p.93-107, 1995.
- 184 RAGHAVAN, V. **Experimental vascular embryogenesis in vascular plants**. London: Academic Press, 1976. 603p.
- 185 RAI, V. R. ; CHANDRA, K. S. J. Micropropagation of indian rosewood by tissue culture. **Ann. Bot.**, London, v. 64, p. 43-46, 1989.
- 186 RAJASEKARAN, P. Production of clonal plantlets of *Grevillea robusta* in *in vitro* culture via axillary bud activation. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 39, p. 277-279, 1994.

- 187 RAO, M. M.; SITA, G. L. Direct somatic embryogenesis from immature embryos of rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 355-359, 1996.
- 188 REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. Encapsulated plant embryos. In: MIZRAHI, A. (Ed.) **Biotechnology in agriculture**. New York: Alan R. Liss, 1988. p. 225-248.
- 189 REINERT, J. Morphogenese und ihre controlle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, Berlin, n. 45, p. 344-345, 1958.
- 190 REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S.; SZBELL, B. Aspects of organization: organization, embryogenesis, cytodifferentiation. In: STREET, H. E. (Ed.) **Plant tissue and cell culture**. Berkeley, University of California, 1977. p. 348-427.
- 191 RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 296 p.
- 192 ROBERTS, D. R.; SUTTON, B. C. S.; FLINN, B. S. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 68, p. 1086-1090, 1990.
- 193 RODRIGUEZ, A. P. M. **A morphological and histological characterization of the results of auxin type and concentration on induction and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenesis**. Athens, 1994. (Tese Doctor of Philosophy) University of Georgia 93p.
- 194 ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis in *Simarouba glauca*. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 79-81, 1994.
- 195 SAKAI, W. S.; Simple method for differential staining of parafin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.
- 196 SANCHEZ, M. C.; SAN-JOSE, M. C.; FERRO, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. **J. Hortic. Sci.**, England, v. 72, n. 3, p. 433-443, 1997.
- 197 SAN-JOSE, M.C.; VIEITEZ, A. M.; BALLESTER, A. Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. **Silvae Genet.**, Frankfurt, v.39, n. 2, p. 50-55, 1990.
- 198 SANKHLA, D.; DAVIS, T. D.; SANKHLA, N. Thidiazuron-induced *in vitro* shoot formation from roots of intact seedlings of *Albizia julibrissin*. **Plant Growth Regul.**, Dordrecht, v. 14, p. 267-272, 1994.
- 199 SANTOS, E. **Nossas madeiras**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 313 p.
- 200 SANTOS, A. V. P.; CUTTER, E. G.; DAVEY, M. R. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfafa) **Protoplasma**, Viena, v. 117, p. 108-115, 1983.
- 201 SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. F. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/CNPH, 1990. p. 227-249.

- 202 SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Ann. Bot.**, London, v. 62, p. 43-52, 1988.
- 203 SHARMA, A.; KUMAR, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf-derived cell suspension of a mature tree – *Thevetia peruviana* L. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 14, p. 171-174, 1994.
- 204 SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; SONDAHL, M. R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p. 759-762.
- 205 SHARP, W. P.; SONDAHL, M. R.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Hortic. Rev.**, New York: v. 2, p. 268-310, 1980.
- 206 SILVA, A. da; FIGLIOLIA, M. B.; AGUIAR, I. B. de. Secagem, extração e beneficiamento de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PINA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.303-351.
- 207 SKOOG, F.; MILLER, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-130, 1957.
- 208 SMITH, D. L.; KRIKORIAN, A. D. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 77, n.12, p. 1634-1647, 1990.
- 209 SOUZA, L. A. de; MOSCHETTA, I. S. Morfo-anatomia do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 3, p. 439-447, 1992.
- 210 STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. **Ann. Bot.**, London, v. 59, p. 451-459, 1987.
- 211 STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.
- 212 STEWARD, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures from freely suspended cells. **Am. J. Bot.**, London, v. 45, p. 705-708, 1958.
- 213 SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Epicuticular wax formation on carnation plants regenerated from shoot tip culture. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v. 104, n.4, p. 493-496, 1979.
- 214 TAMAS, I A. Hormonal regulation of apical dominance. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant Hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 572-597.
- 215 TANG, D.; ISHII, K.; OHBA, K. *In vitro* regeneration of *Alnus cremastogyne* Burk from epicotyl explants. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 658-661, 1996.
- 216 TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

- 217 TAVARES, A. C.; PIMENTA, M. C.; GONÇALVES, M. T. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, p. 441-444, 1996.
- 218 TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v.34, p. 227-233, 1993.
- 219 TELMER, C. A.; NEWCOMB, W.; SIMMONDS, D. H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. **Protoplasma**, Viena, v. 172, p. 154, 1993.
- 220 THORPE, T. A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. In: VASIL, I. K. **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.
- 221 _____. *In vitro* somatic embryogenesis. **Atlas of Science**. p. 81-88, 1988.
- 222 THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 331-336.
- 223 _____. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 17-35.
- 224 THORPE, T. A.; KUMAR, P. P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Micropropagation of woody plants**. Netherlands: Kluwer Academic, 1993. p.11-29.
- 225 THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Academic Press, 1984. p. 49-58.
- 226 TISSERAT, B.; ESAN, E. B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in Angiosperms. **Hortic. Rev.**, New York, v. 1, p. 1-78, 1979.
- 227 TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. C. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG, T. L.; CUMING, A. **Embryogenesis: the generation of a plant**. Oxford: Bios Scientific, 1996. p. 173-186.
- 228 TRAN THANH VAN, K. M. Control of morphogenesis in vitro cultures. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 32, p. 291-311, 1981.
- 229 TRINDADE, H.; FERREIRA, J. G.; PAIS, M. S.; ALONI, R. The role of cytokinin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. **Aust. For.**, Canberra, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.
- 230 TULECKE, W.; MC GRANAHAHAN, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut *Juglans regia* L. **Plant Sci.**, Limerick, v. 40, p. 57-63, 1985.
- 231 VAN DER LINDE, P. C. G. Hormone action and sensitivity: possible relation to aging. In: RODRIGUES, R.; SANCHES, M.; TAMES, R.; DURZAN, D.J. eds. **Plant aging: basic and applied approaches**. New York: Plenum Press, 1990. p. 285-292.
- 232 VASIL, I. K.; Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p. 101-103.

- 233 _____. Automation of plant propagation. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 39, p. 105-108, 1994.
- 234 VEISSEIRE, P.; LINOSSIER, L.; COUDRET, A. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, Dordrecht, v. 39, p. 219-223, 1994.
- 235 VICIENT, C. M.; MARTÍNEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 1-12, 1998.
- 236 VIEITEZ, A. V.; SAN-JOSE, M. C.; VIEITEZ, E. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. **J. Hortic. Sci.**, England, v. 60, n. 1, p. 99-106, 1985.
- 237 VIEITEZ, A. V.; SAN-JOSE, M. C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. **J. Plant. Physiol.**, v. 136, p. 253-256, 1990.
- 238 von ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Can. J. Bot.**, Ottawa, n. 59, p. 870-874, 1981.
- 239 WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. **Growth and differentiation in plants**. Oxford: Pergamon Press, 1981.
- 240 WEST, M. A. L.; HARADA, J. J. Embryogenesis in higher plants: an overview. **Plant Cell**, v. 5, p. 1361-1369, 1993.
- 241 WETZSTEIN, H. Y.; BAKER, C. M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Sci.**, Limerick, v. 92, n.1, p.81-89, 1993.
- 242 WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, London, v. 57, p.443-462, 1986.
- 243 YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 205-248.
- 244 ZAZI, M. A. M.; DICKISON, H. G. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. **Protoplasma**, Viena, v. 156, p. 149, 1990.
- 245 ZHENG, Q.; DESSAI, A. P.; PRAKASH, C. S. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v. 15, n. 6, p. 381-385, 1996.
- 246 ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.